Səkkizinci
Nəşir
I cild

MOLEKULYAR HÜCEYRƏ BİOLOGİYASI

Lodiş
Berk
Kaiser
Krieger
Bretsçer
Ploegh
Amon
Martin

Molekulyar Hüceyrə Biologiyası

I cild

Bakı 2023

MÜƏLLİFLƏR HAQQINDA

HARVEY LODIŞ Massaçusetts Texnologiya İnstitutunun (MIT) Biologiya üzrə professoru və Bioloji Mühəndislik üzrə professordur, həmçinin Whitehead Biotibbi Tədqiqatlar Institutunun Təsisçi üzvüdür. Lodiş Milli Elmlər Akademiyasının, həmçinin Amerika İncəsənət və Elmlər Akademiyasının üzvüdür, o Amerikanın Hüceyrə Biologiyası Cəmiyyətinin Prezidenti (2004) olmuşdur. O, hüceyrə-membran fiziologiyası üzrə tədqiqatlarına görə, xüsusən də çox hüceyrə-səth zülallarının sintezi üzrə, eritropoietin və TGF-β reseptorları kimi bir sıra hüceyrə-səth zülallarının klonlaşdırılması və funksional analizi üzrə məşhurdur. Onun laboratoriyası həmçinin hematopoietik və adiposit hüceyrələrin inkişafını fə funksiyasını tənzimləyən uzun kodlaşdırmayan RNT-lər və mikro RNT-lər üzrə də tədqiqatlar aparır. D. Lodiş hüceyrə biologiyası üzrə və biotexnologiya üzrə bakalavr və magister/PhD səviyyəsində kursları tədris edir. *Şəkil Jon Soares tərəfindən verilmişdir.*

ARNOLD BERK UCLA-də Mikrobiologiya, İmmunologiya və Molekulyar Genetika Şöbəsində Molekulyar Hüceyrə Biologiyası üzrə prezident kürsüsünü tutur, o həmçinin Los Anceles Kaliforniya Universitetindəki Molekulyar Biologiya İnstitutunun üzvüdür. Dr. Berk eyni zamanda Amerika İncəsənət və Elmlər Akademiyasının üzvüdür. O, RNT splaysinqi və viruslarda genə nəzarət mexanizmlərini kəşf edənlərdən biridir. Onun laboratoriyası, adenovirus tənzimləyici zülallara xüsusilə diqqət yetirərək məməli hüceyrələrində transkripsiyanın inisiasiyasını tənzimləyən molekulyar qarşılıqlı əlaqələri araşdırır. O, nüvənin hüceyrə biologiyası üzrə qabaqcıl bakalavr kursunu və biokimya üzrə magistr/PhD kursunu tədris edir. *Şəkil: Penny Jennings/UCLA Kimya və Biokimya şöbəsi tərəfindən təqdim edilmişdir*.

KRIS A. KAISER Massaçusetts Texnologiya İnstitutunun Biologiya Bölməsində Amgen Inc Professorudur. O həmçinin keçmiş prorektor və keçmiş şöbə müdiridir. Onun laboratoriyası yeni sintez olunmuş membran və ifrazat zülallarının necə büküldüyünü və ifrazat yolunun kompartmentində necə saxlanıldığını başa düşmək üçün genetik və hüceyrə biologiyası metodlarından istifadə edir. Dr. Kaiser MIT-də ən yüksək səviyyədə dərs keçən pedaqoq kimi tanınmışdır, o burada uzun illərdir bakalavr səviyyəsində genetikanı tədris edir. *Şəkil Xris Kaiser tərəfindən verilmişdir*.

MONTİ KRIEGER Massaçusetts Texnologiya İnstitutunun (MIT) Biologiya bölməsində Whitehead Professordur, MIT və Harvardın geniş profildə müxbir üzvüdür. Dr. Krieger həmçinin Milli Elmlər Akademiyasının üzvüdür. O, bakalavr səviyyəsində biologiyanın və insan fiziologiyasının innovativ tədrisinə görə, eləcə də məzunlara hüceyrə biologiyası kurslarına görə dəfələrlə təltiflər almışdır. Onun laboratoriyası Qolci aparatında membran daşınması üzrə bizim anlayışlarımıza, həmçinin patogen tanınmasında əhəmiyyətli olan reseptor zülallarının klonlaşdırılmasında və xarakterizə olunmasında, HDL reseptor da daxil olmaqla xolesterinin hüceyrə daxilinə və xaricinə keçməsinin öyrənilməsində öz töhfəsini vermişdir. F*oto Monti Krieger tərəfindən verilmişdir*.

ANTHONİ BRETŞHER Kornel Universitetinin hüceyrə biologiyası üzrə professoru və Hüceyrə və Molekulyar biologiyası üzrə Veill İnstitutun üzvüdür. Onun laboratoriyası aktin sitoskeletin yeni komponentlərinin identifikasiyası və öyrənilməsi üzrə, həmçinin bu komponentlərin bioloji funksiyasının membran daşınması və hüceyrə polyarlığı aspektində aydınlaşdırılması üzrə məşhurdur. Bu işlərə görə, onun laboratoriyası iki model sistemdə - onurğalıların epiteli hüceyrələrində və tumurcuqlayan mayada biokimyəvi, genetik və hüceyrə biologiyası yanaşmalarından istifadə edir. Doktor Bretşer Kornel universitetində bakalavr səviyyəsində hüceyrə biologiyasını tədris edir. *Şəkil Antoni Bretşer tərəfindən verilmişdir*.

HIDDE PLOEGH Massaçusets Texnologiya İnstitutunun Biologiya üzrə professoru və Whitehead Biotibbi Tədqiqatlar Institutunun üzvüdür. İmmun sisteminin davranışında dünyanın aparıcı tədqiqatçılarından biri olan Doktor Ploegh virusların immun cavablarından yayınmaq üçün istifadə etdiyi müxtəlif taktikaları və immun sisteminin dostu düşməndən ayırması yollarını araşdırır. Dr Ploegh Harvard Universitetində və MIT-də təhsil alan tələbələrə immunologiya fənnini tədris edir. *Şəkil Hadde Poleigh tərəfindən verilmişdir*.

ANGELIKA AMON, Massachusetts Texnologiya İnstitutunun Biologiya üzrə professoru, Koch İnteqrativ Xərçəng Tədqiqatları İnstitutunun üzvü və Howard Hughes Tibb İnstitutunda tədqiqatçıdır. O, həmçinin Milli Elmlər Akademiyasının üzvüdür. Onun laboratoriyası, mitoz və meyoz zamanı xromosom seqreqasiyasını tənzimləyən molekulyar mexanizmləri, hüceyrələrin normal proliferasiyası zamanı və xərçəngin inkişafı zamanı bu mexanizmlər uğursuz olduqda onun nəticəsi olan aneolopiyanı öyrənir. Doktor Amon, bakalavr və magister/PhD səviyyəsində hüceyrə biologiyası və genetika fənlərini tədris edir. *Şəkil Pamela DiFraia/Koch Institut/MIT tərəfindən verilmişdir*.

KELSEY C. MARTIN Los-Ancelesdəki Kaliforniya Universitetinin David Geffen Tibb Məktəbinin Bioloji Kimya və Psixiatriya üzrə professoru və müvəqqəti Dekanıdır (interim Dean). Bioloji Kimya şöbəsinin keçmiş müdiridir. Onun laboratoriyası, təcrübələr zamanı uzun müddətli yaddaşı saxlamaq üçün beyindəki neyronlar arasında əlaqələri dəyişdirməyin yollarını - sinaptik plastiklik kimi məlum olan prosesi öyrənir. O, bu prosesin əsasında duran molekulyar və hüceyrə biologiyası mexanizmlərinin izah edilməsində mühüm töhfələr vermişdir. Dr Martin, bakalavırlara və magistr/PhD tələbələrə, stomotoloji tələbələrə, və tibb üzrə tələbələrə nevrologiyanın əsas prinsiplərini tədris edir. *Şəkil Fuong Fam tərəfindən verilmişdir*.

Bizim öyrənməkdə davam etdiyimiz
MÜƏLLİMLƏRİMİZƏ VƏ TƏLƏBƏLƏRİMİZƏ
VƏ
bizi dəstəklədiyinə, ruhlandırdığına və sevdiyinə görə
AİLƏLƏRİMİZƏ HƏSR OLUNUR

Tərcümə edən, AR ETN Biofizika İnstitutunun əməkdaşı, **b.ü.e.d. Kərim Q. Qasımov**

Elmi redaktorlar:

AMEA-nın müxbir üzvü Oktay K. Qasımov,

AMEA-nın müxbir üzvü İlham Ə. Şahmuradov,

f-r.ü.e.d. Yaşar M. Feyziyev

Ayrı-ayrı fəsilləırin oxunmasında və redaktəsində tibb elmləri üzrə fəlsəfə doktoru Azad Əbdürəhimov, kimya üzrə fəlsəfə doktoru Arif B Bədəlov, AMEA Biofizika institutunun elmi işçisi Mətanət Baxışova, kiçik elmi işçisi Türkan Səmədova və kiçik elmi işçisi Günay Əliyeva iştirak etmişlər.

MÜQƏDDİMƏ (ÖNSÖZ)

Molekulyar Hüceyrə Biologiyasının səkkizinci nəşrinin yazılışında biz son dörd il ərzində, qismən çox sahədə inqılab edən yeni eksperimental texnologiyalar tərəfindən idarə olunan biotibbi elmlər sahəsində əldə olunmuş möhtəşəm nailiyyətləri əhatə etmişik. DNT ardıcıllığının oxunmasında sürətli metodların və model orqanizmlərdə mutasiyaların yaradılaraq öyrənilməsi və insanlarda xəstəlik əmələ gətirən mutasiyaların xəritələşdirilməsində başqa metodlarla birgə istifadə edilməsi çox hüceyrə komponentlərinin, o cümlədən diabet və xərçəng kimi xəstəliklərin yaranmasına səbəb olan yüzlərlə insan genlərinin funksiyasındakı əsas anlayışları işıqlandırdı.

Məsələn, genomiksin və bioinformatikanın inkişafı genlərin ekspressiyasını tənzimləyən minlərlə yeni uzun kodlaşdırmayan RNT-lərin aşkar edilməsinə səbəb oldu və bir çox insan xəstəliklərinin potensial müalicəsi üçün yeni ideyaları yaratdı. Güclü genom redaktə texnologiyası canlı orqanizmlərin çox tiplərində genlərin tənzimlənməsinin və funksiyasının misli görünməmiş dərəcədə anlaşılmasının əsasında durdu. Mass spektrometriyada və krioelektron mikroskopiyada nailiyyətlər dinamik hüceyrə proseslərinin möhtəşəm detallarına qədər vizuallaşdırılmasını mümkün etdi, bioloji molekulların quruluş və funksiyasında, posttranslaysiya modifikasiyalarında, çoxzülallı komplekslərdə və orqanoidlərdə dərin bilikləri təmin etdi. Canlı orqanizmdə spesifik sinir hüceyrələrinin öyrənilməsi optogenetik texnologiyalarla inkişaf etdirilmişdir. Sütun-hüceyrə texnologiyasındakı nailiyyətlər sütun hüceyrələrin bitkilərin inkişafında və planarinin regenerasiyasında rolunun öyrənilməsindən meydana gəlmişdir.

Bu sahədə ən müasir inkişafı axtarmaq yeni nəşrin yazılması üçün bir prioritetdir, amma, lakin diqqəti hüceyrə biologiyasının əsas anlayışlarına yönəltmək üçün mümkün qədər çox kənar təfərrüatları silməklə hüceyrə biologiyasının əsaslarını aydın şəkildə izah etmək bizim üçün də vacibdir. Bu məqsədlə, yeni kəşfləri və texnologiyaları təqdim etməklə yanaşı, tələbələr üçün proses və konsepsiyaları aydınlaşdırmaq məqsədi ilə bir neçə fəsildə düzəlişlər edib yenidən qurduq.

Yeni Həmmüəllif Kelsey C. Martin

MHB-nın yeni nəşri bizim müəlliflər komandasına yeni üzvü təqdim etdi, Kaliforniya Universitetinin aparıcı neyrotədqiqatçı alim pedaqoqu Kelsey C. Martin bioloji kimya və psixiatriya üzrə professordur, UCLA-də David Geffen tibb fakultəsinin müvəqqəti dekanıdır. Onun laboratoriyası, uzun müddətli yaddaşın meydana gəlməsinin hüceyrə və molekulyar biologiyasını anlamaq üçün *Apliysia* və siçan modellərindən istifadə edir. Onun qrupu, beyində sinaptik plastiklik kimi tanınan, uzunmüddətli yaddaşı saxlamaq üçün beyində neyronlar arasında əlaqələrin dəyişilməsi kimi prosesin molekulyar və hüceyrə bioloji mexanizmlərinin izahına mühüm töhfələrini vermişdi. Dr. Martin bakalavr təhsilini Harvard Universitetində İngilis və amerikan dili və ədəbiyyat üzrə almışdır. O, Sülh Korpusu yolu ilə Konqo Demokratik Respublikasında könüllü xidmət etdikdən sonra, Yeil (Yale) universitetində MD və PhD dərəcələrini müdafiə etdi. O, bakalavr, doktorant, stomatoloji və tibbi tələbələrə neyrobiologiyanın əsaslarından dərs deyir.

Yenidən işlənmiş, Təfərrüatlı Məzmun

Molekulyar Hüceyrə Biologiyasının səkkizinci nəşri mükəmməlləşdirilmiş fəsilləri əhatə edir:

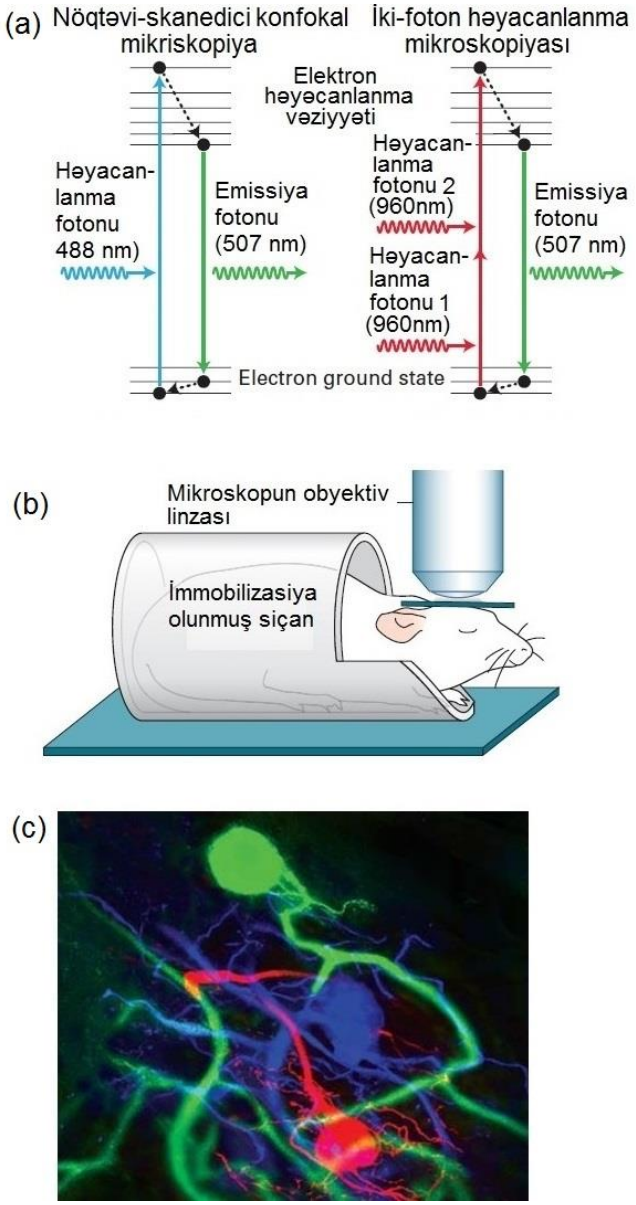
- "Molekullar, Hüceyrələr və Model Orqanizmlər" (Fəsil 1) hüceyrə biologiyasına mükəmməlləşdirilmiş və genişləndirilmiş girişdir. O təkamülə, molekullara, həyatın müxtəlif formalarına və əvvəlki nəşirlərdə olan hüceyrə biologiyasının tədqiqatlarında istifadə edilən model orqanizmlərə ümumi baxışı, əhatə edir. Bu nəşirə, əvvəllər Fəsil 9-da əhatə olunan eukaryotik orqanoidlərə baxış da daxil edilmişdir.

- "Hüceyrələrin Kultura Olunması və Vizuallaşdırılması" (Fəsil 4) inkişaf etdirilərək (əvvəliki nəşrdə Fəsil 9) hüceyrələrin öyrənilməsində tətbiq edilən bir metod kimi daha böyük əhəmiyyət kəsb edir. Bu fəsili mükəmməlləşdirmək üçün işıq-təbəqə mikroskopiyası, super-rezolyusiyalı mikroskopiya və ikçi-fotonlu həyacanlanma mikroskopiyası əlavə edilmişdir.

- Mitoxondri və xloroplastın quruluşunun və funksiyasının bütün aspektləri "Hüceyrə Energetikası" fəslində cəmlənmişdir (Fəsil 12). Bu fəsil indi mitoxondrinin quruluşu ilə, o cümlədən orqanoid genomunun endosimbiotik mənşəyi (əvvəllər Fəsil 6) ilə başlayır. İndi bu fəsil mitoxondri ilə assosasiyada olan membranları (MAM) və mitoxondrilər ilə hüceyrənin qalan bütün başqa hissələri arasındakı kommunikasiyanı müzakirə edir.

- Hüceyrədə siqnal ötürülməsi tələbələrin anlamasını yaxşılaşdırmaq üçün yenidən işlənilmişdir. "Siqnal Ötürülməsi və G Zülallarla-Cütləşən Reseptorlar" (Fəsil 15) hüceyrənin siqnal ötürməsinin konsepsiyalarına və onu öyrənmək üçün metodlara ümumi baxışla başlayır və müxtəlif hüceyrələrdə çoxsaylı funksiyaları yerinə yetirən, G zülallarla-cütləşən reseptorların nümunələri ilə davam edir. "Gen Ekspressiyasını Tənzimləyən Siqnal Yolu" (Fəsil 16) Smad-lərin yeni müzakirəsi ilə başlayaraq diqqəti gen ekspressiyasına yönəldir. Daha sonrakı nümunələr, tələbələrin hüceyrə metabolizmində, zülalların parçalanmasında və hüceyrə differensasiyasında rastlaşacaqları əsas siqnal yollarının əhatə edir. Xüsusi marağı yeni bölmə, planari üzərində sütun-hüceyrə ilə differensasiyanın Wnt və Notch siqnal yolu ilə nizamlanması kəsb edir. Fəsil, qlükoza metabolizminə insulin və qlükaqon nəzarətinin hüceyrə cavabını həyata keçirmək üçün siqnal yollarını necə inteqrasiya etməsini təsvir etməklə sona çatır.

- Bizim yeni həmmüəllifimiz, Kelsi K. Martin "Sinir Sistemi Hüceyrələri"ni (Fəsil 22) geniş şəkildə yeniləmiş, bu sahəyə bir sıra yeni inkişaf problemlərini daxil etmişdir. Hüceyrənin membran potensialını pozmaq üçün kanalrodopsinlər və işıqdan istifadə edən metod olan Optogenetika, canlı heyvanlarda sinir yollarını davranışla əlaqələndirmək üçün istifadə edilə bilər. .Mərkəzi sinir sistemindəki sinir yollarının meydana gəlməsi və qısaldılması prosesində fəal araşdırmalar aparılır və bu prosesləri tənzimləyən siqnalların yeni müzakirəsi bura daxil olan hüceyrə-hüceyrə əlaqələrinə yönəldilmişdir. Bu müzakirə tamamilə yeni bölmənin, sinaptik plastikliyin əsasında duran molekulyar mexanizmləri və siqnalları tədqiq edən öyrənmək və yaddaş bölməsinin daxil edilməsinə səbəb olur.



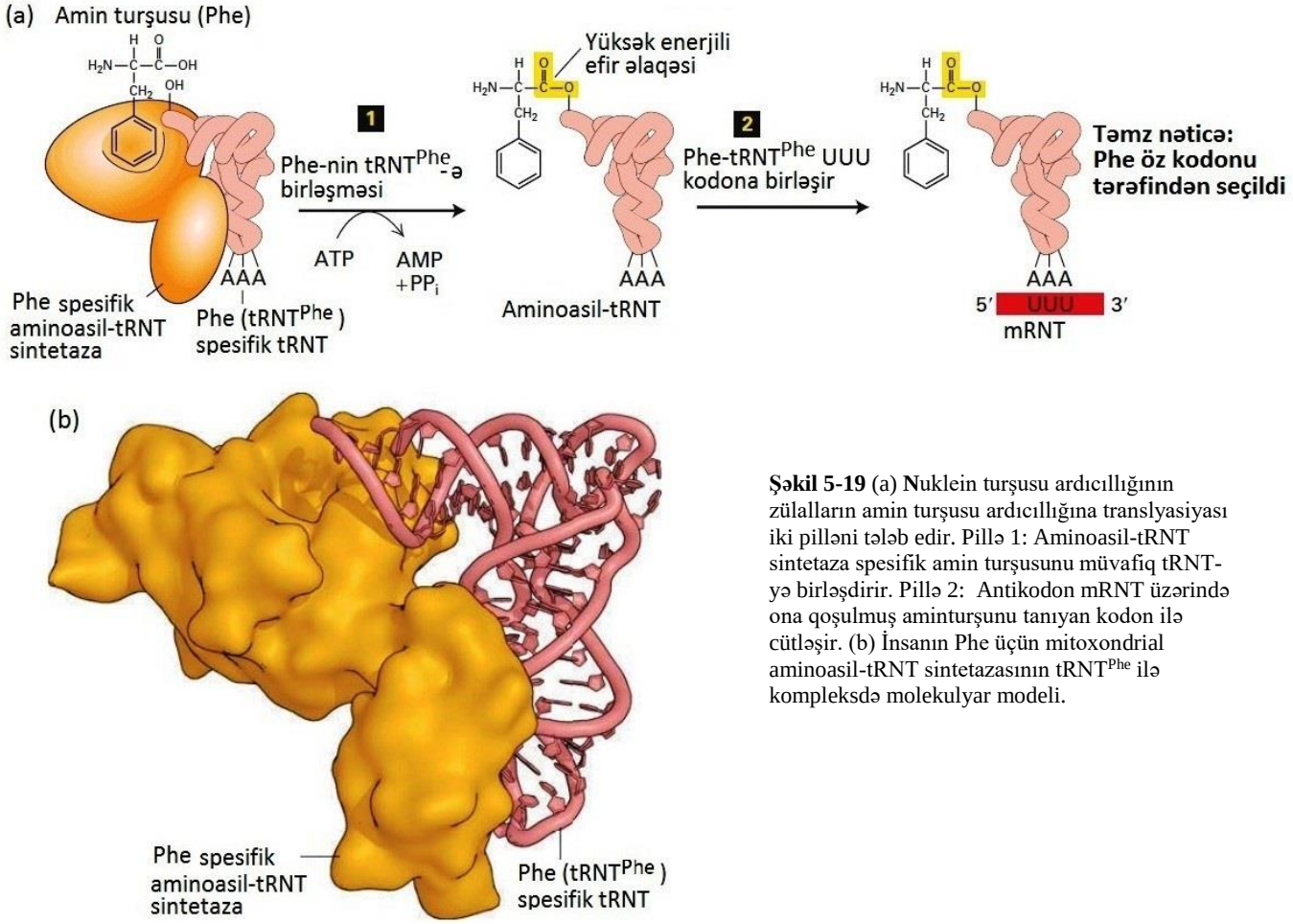
Şəkil 4-21 İki foton həyəcanlanma mikroskopiyası, canlı orqanizmdə görüntünün dərin nüfuz etməsinə imkan yaradır. (a) Diaqram ənənəvi nöqtəvi-skanninq konfokal mikroskopiyada və iki-foton həyacanlandırma mikroskopiyasında istifadə edilən fərqli həyacanlanma metodlarını təsvir edir. Ənənəvi sistemdə müvafiq dalğa uzunluğunda bir fotonun udulması elektronun həyacanlanmış vəziyyətə sıçraması ilə nəticələnir. İki-foton həyacanlanmasında, müvafiq dalğa uzunluğunda olan iki foton demək olar ki, dərhal gələr, hər ikisi udula bilir və elekttonların həyacanlanmış vəziyyətə tullanmasını induksiya edir. (b) İki-foton mikroskopiyası, mikroskop ştativinə yerləşdirilmiş canlı heyvanda 1 mm dərinlikdə olan hüceyrələri müşahidə etmək üçün istifadə oluna bilir. (c) Lobster xərçəngin neyronlarının təsviri təsviri iki-foton mikroskopiyadan istifadə edilərək alınmışdır. [(d) hissəsi Peter Kloppenburg və Warren R. Zipfel nəşr olunmamış materialları.]

Yüksək aydınlıq, təkmilləşdirilmiş pedaqogika

Həm bakalavr, həm də magister və doktorant tələbələrin təcrübəli müəllimi kimi, biz həmişə tələbələrin anlamasını yaxşılaşdırmaq üçün cəhd edirik. Molekulu fəaliyyət göstərdiyi halda vizuallaşdırmaq qabliyyətinə malik olmaq tələbələrin hüceyrə daxilində molekulyar prosesləri anlamasına dərin təsir göstərir. Bunu nəzərə alaraq, yüksək aydınlıq üçün bir çox molekulyar modelləri yenilədik və tələbələrin anlayışını dərinləşdirə biləcək əlavə modelləri daxil etdik. tRNT yüklənməsinin tam uyğun gəlməsi üçün tələb olunan dəqiqlikdən, ribosom quruluşunun qorunub saxlanmasına, əzələ dartılmasında tropomyozin və troponinin dinamik gücünə qədər, bu rəqəmlər təkcə sxematik diaqramlarda çatdırıla bilməyən molekulyar quruluşun mürəkkəb detallarını çatdırır. Bu yeni modellərlə birlikdə, tələbələrin hüceyrədə bir quruluşun molekulyar detalları ilə funksiyası arasındakı rəvan keçidinə imkan verən sxematik nişanlar onları daha dəqiq təmsil etmək üçün yenidən işlənilmişdir.

Yeni kəşflər, yeni metodologiyalar

- Model orqanizmlər *Chlamydomonas reinhardtii* (qamçıların, xloroplastın yaranmasının, fotosintezin və fototaksisin tədqiqi üçün) və *Plasmodium falciparum* (yeni orqanoidlərin kompleks həyat tsiklinin öyrənilməsi üçün) (Fəsil 1)
- Daxilindən pozulmuş zülallar (Fəsil 3)
- Çaperonla-yönəldilən bükülmə və yenilənmoş çaperon quruluşu (Fəsil 3)
- Bükülməmiş zülallar, amiloid vəziyyəti və xəstəliklər (Fəsil 3)
- Hidrogen/deyterium mübadiləli mass spektrometriya (HXMS) (fəsil 3)
- Fosfoproteomiks (Fəsil 3)
- İki-fotonlu həyacanlanma mikroskopiyası (Fəsil4)
- İşıq-təbəqə mikroskopiyası (Fəsil 4)
- Super-rezolyusiyalı mikroskopiya (Fəsil 4)
- Üç-ölçülü matrisa və 3d printinq (Fəsil 4)
- Domenlər üzrə ribosom quruluşunun müqayisəsi konservativ özəyi göstərir (Fəsil 5)
- Bakteriyalarda CRISPR-Cas9 sistemi və genom redaktəsində onun tətbiqi (Fəsil 6)
- Xromosom konformasiyasının tutulması metodu nüvə daxilində xromosom ərazilərindəki topoloji domenləri aşkar edir (Fəsil 8)
- Dnaza I-in hiperhəssas saytlarının xəritələşdirilməsi bütün inkişaf tarixini aşkar etdi (Fəsil 9)
- Uzun kodlaşdırmayan RNT-lər məməlilərdə X fəalsızlaşmada (inaktivasiyada) iştirak edir (Fəsil 9)
- ENCODE verilənlər bazası (Fəsil 9)
- mRNT parçalanması yollarının təkmilləşdirilmiş müzakirəsi və sitoplazmada RNT nəzarəti (Fəsil 10)
- Nüvə cismləri: P cismlər, Kajal cismlər, histon lokus cismləri, nüvə ləkələri, paraspekllar və PML nüvə cismləri (Fəsil 10)



Şəkil 5-19 (a) **N**uklein turşusu ardıcıllığının zülalların amin turşusu ardıcıllığına translyasiyası iki pilləni tələb edir. Pillə 1: Aminoasil-tRNT sintetaza spesifik amin turşusunu müvafiq tRNT-yə birləşdirir. Pillə 2: Antikodon mRNT üzərində ona qoşulmuş aminturşunu tanıyan kodon ilə cütləşir. (b) İnsanın Phe üçün mitoxondrial aminoasil-tRNT sintetazasının $tRNT^{Phe}$ ilə kompleksdə molekulyar modeli.

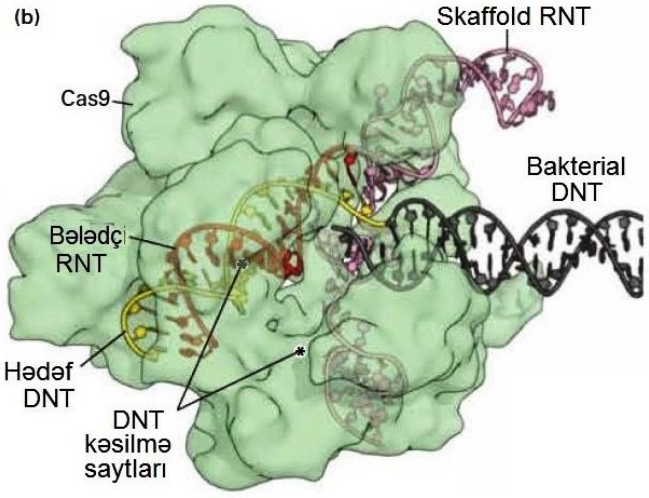
- GLUT1 molekulyar model və daşınma tsikli (Fəsil 11)

- PTS1-daşıyan zülalların peroksisomal matrisa daxilinə importu yolunun genişləndirilmiş müzakirəsi (Fəsil 13)
- Rab zülalların və qovucuqların hədəf membranla qovuşmasında onların rolunun genişləndirilmiş müzakirəsi (Fəsil 14)

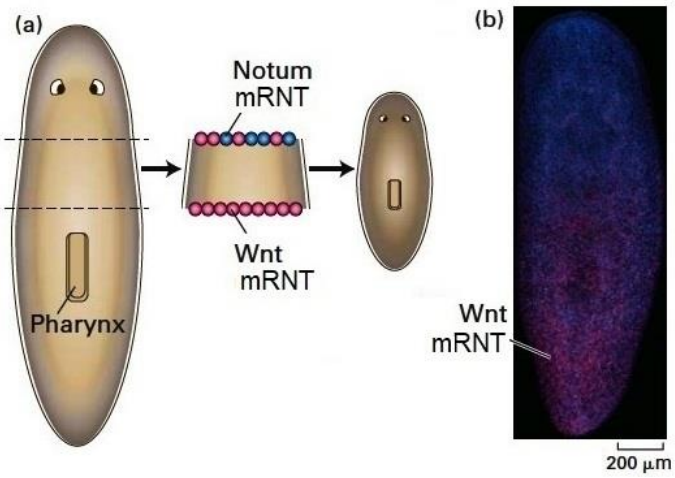
İnsanın G zülala-cütləşən reseptorunun farmaseptik əhəmiyyəti (Fəsil 15)

Smad-lərin xromatin modifikasiyasında rolu (Fəsil 16)

- Planarinin inkişafında və regenerasiyasında Wnt qatılıq qradientləri (Fəsil 16)
- Adipoz hüceyrə funksiyasında və şişmanlıqda iltihab hormonları (Fəsil 16)
- Qanda qlükozanın nəzarət olunmasında insulin və qlükaqonun tənzimlənməsi (Fəsil 16)
- Ürək infarktının kəskinliyinin indikatoru kimi troponinlərin istifadə olunması (Fəsil 17)
- Dərinin bütövlüyündə iştirak iştirak edən neyrofilamentlər və keratinlər, epidermoliz bulloza simpleks (Fəsil 18)

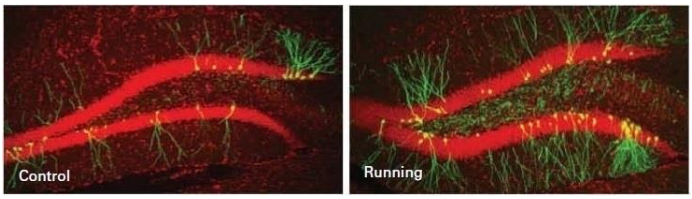


Şəkil 6-43b Cas9 spesifik DNT ardıcıllığını identifikasiya etmək və onu kəsmək üçün bələdçi RNT-dən istifadə edir.



Şəkil 16-31 Wnt və Notum-un qradienti planaridə başın və ya quyruğun regenerasiyasına bələdçilik edir. [(b) hissəsi Jessica Witchley və Peter Reddiendən]

- Dynein və dynaktinin funksiyasının yeni quruluşları və anlaşılması (Fəsil 18)
- Laminlərin və onların mitoz zamanı nüvə membranının quruluşunda və dinamikasında rolunun genişləndirilmiş müzakirəsi (Fəsil 18)
- Kohezin qüsurları ilə bağlı olan xəstəliklər (Fəsil 19)
- Hippo yolu (Fəsil 19)
- Siçanlarda şpindel nəzarət nöqtəsinin yığılması, ayrılmama və aneuploideya; ayrılmama ananın yaşının artması ilə artır (Fəsil 19)



Şəkil 22-8 Yetkin beyinin neyrogenezisi. (c) Yeni doğulmuş neyronlar nəzarət siçanın və qaçma təkərində məşq etməsinə imkan verilmiş siçanın dişli beyin qırışında GFP ilə nişanlanmışdır. [Chunmei Zhao and Fred H. Gage.]

- Hüceyrəxarici matrisanın funksiyalarının və onun toplanmasında hüceyrələrin rolunun genişləndirilmiş müzakirəsi (Fəsil 20)
- Mexanotransduksiya (Fəsil 20)
- Kadherinlərin quruluşu və onların cis və trans qarşılıqlı əlaqələri (Fəsil 20)
- Kadherinlər C sinif rhinoviruslar və astma üçün reseptorlar kimi (Fəsil 20)
- Elastik toxumada və LTBP vasitəsilə TGF-β siqnalında mikrofibrillərin yaxşılaşdırılmış müzakirəsi (Fəsil 20)
- Tunel əmələ gətirən nanoborucuqlar (Fəsil 20)
- WAK-ların bitkilərdə pectin reseptorlar kimi funksiyası (Fəsil 20)
- Siçanın ES hüceyrələrinin pluripotentliyi və müxtəlif xəstəliklərin müalicəsində iPS və ES hüceyrələrdən alınmış differensasiya etmiş hüceyrələrin potensialı (Fəsil 21)
- Planaridə pluripotent ES hüceyrələr (Fəsil 21)
- Bağırsaq sütun hüceyrələrini artırmaq üçün bağırsaq kriptlərindəki differensasiya edən hüceyrələr (Fəsil 21)
- Hüceyrə polyarlığına nəzarət edən Cdc42 və geriyə əlaqə ilgəkləri (Fəsil 21)
- Prokariotik gərginliklə-nizamlanan Na^+ kanalının quruluşu gərginliklə-nizamlanan K^+ kanalları ilə müqayisəyə imkan verir (Fəsil 22)
- Sinir sistemini davranışla əlaqələndirən optogenetika metodları (Fəsil 22)
- Öyrənməni və yaddaşı idarə edən sinaptik plastikliyin mexanizmləri (Fəsil 22)
- İnflammasomlar və qeyri-TLR nuklein turşusu sensorları (Fəsil 23)
- Somatik hipermutasiyaların genişləndirilmiş müzakirəsi (Fəsil 23)
- MHC molekul siniflərinin yaxşılaşdırılmış müzakirəsi; MHC-peptid kompleksləri və onların T hüceyrələrlə qarşılıqlı təsiri (Fəsil 23)
- T hüceyrələrinin nəsil bağlılığı (Fəsil 23)
- Şiş immunologiyası (Fəsil 23)
- Xərçəng hüceyrələrinin xarakteristikası və onların normal hüceyrələrdən necə fərqlənmələri (Fəsil 24)
- Karsinogenlər mutasiyaya necə səbəb olur və xərçəngdə mutasiyalar necə toplanırlar (Fəsil 24)

Tibbi əlaqələr

Fundamental hüceyrə və molekulyar biologiyadakı bir çox irəliləyiş xərçəng və digər insan xəstəlikləri üçün yeni müalicələrin yaranmasına səbəb oldu. Belə tibbi irəliləyişlərin nümunələri fəsillər boyunca tələbələrin öyrəndikləri fundamental elmin klinik tətbiqetmələrini qiymətləndirməsinə imkan verir. Bu tətbiqetmələrin əksəriyyəti hüceyrələrdəki çoxzülallı komplekslərin - hüceyrə hərəkətlərini kataliz edən, DNT transkripsiyasını, replikasiyasını və reparasiyasını tənzimləyin, maddələr mübadiləsini əlaqələndirən və hüceyrələri onların xarici mühitindəki digər hüceyrələrə, zülallara və karbohidratlara bağlayın komplekslərin ətraflı şəkildə başa düşülməsindən asılıdır.

- Dərmanlar kimi kiçik molekulların stereoizomerləri – sterik təmiz molekullar qatışıqdan fərqli təsir göstərirlər. (Fəsil 2)
- Xolesterin hidrofobdur, ona görə də lipozülalları daşıyan daşıyıcılar LDL və HDL ilə daşınmalıdırlar (Fəsil 2)
- Vacib amin turşuları heyvandarlıq yemində təmin edilməlidir (Fəsil 2)

- Doymuş, doymamış və trans yağlar (piylər), onların molekulyar quruluşu və qidalanma nəticələri (Fəsil 2)

- Alzheymer və Parkinson kimi neyrodegenerativ xəstəliklərdə zülalın səhv bükülməsi və amiloidlər (Fəsil 3)

- Fermentin fəallığını ingibirləşdirən kiçik molekullar dərman kimi (aspirin) və ya kimyəvi müharibədə (sarin qazzı) istifadə edilə bilər (Fəsil 3)

- Mutasiyalar və patogenlər vasitəsilə GTPazaların, GAP-ların, GEF-lərin və GDI-ların pozulması müxtəlif xəstəliklərə səbəb olur (Fəsil 3)

- 3D printinq texnologiyası orqanların əvəz edilməsi üçün inkişaf edə bilər (Fəsil 4)

- Ribosomların yüksək rezolyusiyalı quruluşu eukariotik ribosomların deyil, bakteriyaların ribosomlarının kiçik molekullu ingibitorlarının identifikasiyasına kömək edə bilər (Fəsil 5)

- Mismaç (uğun olmayanın) reparasiyası zülallarında mutasiyalar irsi qeyri-polipoz kolorektal xərçəng ilə nəticələnir (Fəsil 5)

- Kseroderma piqmentozumlu xəstələrdə nukleotid atılmasını (eksizyonu) bərpa edən zülallar müəyyən edilmişdir (Fəsil 5)

- İnsanın HTLV, HIV-1 və HPV virusları xüsusi hüceyrə səth molekullarına birləşməklə və bəziləri öz genomunu sahib hüceyrə DNT-sinə inteqrasiya etməklə yoluxmaya səbəb olurlar (Fəsil 5)

- Oraqvari hüceyrəli allel, araşdırılan fenotipə görə həm dominant, həm də resessiv xüsusiyyətlər nümayiş etdirən bir nümunədir. (Fəsil 6)

- DNT mikroarrey tibbi diaqnostik alət kimi sərfəli ola bilər (Fəsil 6)

- Recombinant DNT metodları terapevtik məqsəd üçün sərfəli olan insulin və G-CSF kimi zülalların kütləvi istehsalında istifadə olunur (Fəsil 6)

- Genetik xəstəliklərin əksər hallarına yenidən yaranmış mutasiyalar deyil irsən keçmiş mutasiyalar səbəb olur (Fəsil 6)

- *CFTR* nokaut siçan xətti sistik fibrozisin tədqiqi üçün faydalıdır (Fəsil 6)

- ABO qan tipləri eritrositlərin səgthindəki qlikozülallara qoşulmuş karbohidratlarla təyin edilir (Fəsil 7)

- Ateroskleroz xolesterin, digər lipidlər və başqa bioloji maddələrin arteriyada toplanması ilə qeyd olunur, ABŞ-da ürək-damar xəstəlikləri səbəbindən ölümlərin əksəriyyətinə səbəb olur (Fəsil 7)

- Mikrosatellit təkrarlar genişlənməyə meyillidirvə Hantinqton xəstəliyi və myotonik distrofiya kimi neyroəzələ xəstəliklərinin yaranmasına səbəb ola bilir (Fəsil 8)

- L1 mobil elementlər genomda yeni saytlara insersiya olunaraq genetik xəstəlikləri yarada bilir (Fəsil 8)

- Eqzon qarışdırılması (Exon shuffling), xəstəxanalarda getdikcə artan pproblemlə, antibiotiklərə qarşı bacterialarn rezistentliyi ilə nəticələnir (Fəsil 8)

- Neyrofibromatoz xıstəlkərdə mutasiya olunan *NF1* geni genetik xəstəliklərin molekulyar əsaslarının identifikasiyasında bioinformatika metodunun necə istifadə edilə biləcəyi barədə nümunədir (Fəsil 8)

- Telomeraza bütün xərçənglərdə anormal şəkildə fəallaşır (Fəsil 8)

- TFIIH subvahidləri ilk dəfə bu subvahidlərdə dayandırılmış RNT polimeraza ilə assosasiyada olan DNT reparasiyasında qüsurlara səbəb olan mutasiyalara əsasən identifikasiya olundu (Fəsdil 9)

- HIV RNT polimeraza II ilə transkripsiyanın terminasiyasını ingibirləşdirən Tat zülalını kodlaşdırır (Fəısil 9)

- Sintetik oliqonukleotidlər Düşenne əzələ distrofiyyasının (DMD) müalicəsində istofadə olunur (Fəsil 10)

- Splaysing enhanserlərdə mutasiyalar, onurğa əzələ atrofiyasında olduğu kimi eqzon atılmasına səbəb ola bilir (Fəsil 10)

- Neyronlarda ekspressiya olunan genlərdə mikrosatellit təkrarların genişləndirilməsi mərkəzi sinir sisteminin müxtəlif rayonlarında onların nisbi bolluğunu dəyişə bilir, sinir pozuntularına səbəb olur (Fəsil 10)

- Talassemiya ümumiyyətlə qlobin-genin splaysinqinin effektivliyini azaldan, amma pre-mRNT-nin sn-RNP-lərlə assosasiyasına mane olmayan splays saytlarındakı mutasiyalar nəticəsində yaranır (Fəsil 10)

- mTORC1 yolun komponentlərini kodlaşdıran genlər çox xərçənglərdə mutasiya olunur, başqa terapiyalarda kombinasiya olunan mTOR ingibirorlar isə şişin böyüməsini supressiya edir (Fəsil 10)

- Akvaporin 2 böyrəkdə əmələ gələn sidikdən suyun sorulması sürətini tənzimləyir (Fəsil 11)

- Müəyyən sistik fibroz xəstələri mutant zülalın hüceyrə səthinə normal daşınmasına imkan verən kiçik molekulla müalicə edilirlər (Fəsil 11)

- SGLT2 ingibitorlar inkişaf mərhələsindədir və ya II tip diabetin müalicəsi üçün təsdiq edilmişdir (Fəsil 11)

- Antidepressantlar və digər müalicə dərmanları, eləcə də sui-istifadə edilən narkotik dərmanlar, neyroptransmitterlərin yenidən istifadəsi və sorulmasındakı roluna görə Na^+ ilə işləyən simporterləri hədəf edirlər (Fəsil 11)

- Ürək əzələ hüceyrələrində Na^+/K^+ ATP-azanı ingibirləşdirən dərmanlar xroniki ürək çatışmazlığının müalicəsində istifadə olunur (Fəsil 11)

- Ağızdan rehidratasiya müalicəsi vəba və bağırsaq patogenlərinin səbəb olduğu digər xəstəliklərin müalicəsi üçün sadə, təsirli bir vasitədir (Fəsil 11)

- Xlorid ion kanalı CIC-7-dəki mutasiyalar, irsi sümük xəstəliyi osteopetroz üçün sümük rezorbsiyasının qüsurlu olması ilə nəticələnir (Fəsil 11)

- Mitokondriyal ribosomların xloramfenikol da daxil olmaqla antibiotiklərin aminoqlikozid sinifinə həssaslığı xəstələrdə toksikliyə səbəb ola bilər (Fəsil 12)

- mtDNT-dəkı mutasiyalar və böyük silinmələr, Leberin irsi optik neyropatiya və Kearn-Sayre sindromu kimi bəzi xəstəliklərə səbəb olur (Fəsil 12)

- Sianid mitoxondridə ATP istehsalını blok etdiyindən, o zəhərlidir (Fəsil 12)

- Kardiolipinin miqdarının reduksiyası, eləcə də kardiolipinin anormal quruluşu ürək və skelet əzələ qüsurları ilə və Bartz sindromunu xarakterizə edən digər anormallıqlarla nəticələnir (Fəsil 12)

- Reaktiv oksigen nümunələri elektron daşınmasının hüceyrəni zədələyə bilən əlavə məhsullarıfırlar (Fəsil 12)

- ATP/ADPP antiporter fəallığı ilk dəfə zəhərli bitkilərin təsirinin yoxlanılması yolu ilə 2000 il bundan əvvəl öyrənilmişdir (Fəsil 12)

- Termodinamik piy hüceyrələrinin iki yaxın yarım-tipi vardır (Fəsil 12)

- Emfisemanın irsi forması zülalların endoplazmatik şəbəkədə səhv bükülməsi nəticəsində yaranır (Fəsil 13)

- Qüsurlu peroksisom yığılmasına səbəb olan autosomal resessiv mutasiyalar, çox hallarda Zellveger sindromu ilə əlaqəli olan, kəllə-sifət anormalliqları ilə əlaqəli bir neçə inkişaf qüsuruna səbəb ola bilir (Fəsil 13)

- Bəzi kistik fibroz hallarına CFTR zülalında, bu xlorid kanalının ER-dən hüceyrə səthinə hərəkətinin qarşısını alan mutasiyalar səbəb olur (Fəsil 14)

- Lizosomal ehtiyat saxlama xəstəliklərinin tədqiqi lizosomal çeşidləmə yolunun əsas elementlərini aşkar etmişdir (Fəsil 14)

- Hiperxolesterolemiya kimi məlum olan irsi xəstəlik LDLR genində olan müxtəlif mutasiyalar nəticəsində yaranır (Fəsil 14)

- TNFα reseptorun TNFα-birləşdirən domenindən istifadə edən müalicə dərmanı artrit və digər iltihab şəraitlərinin müalicəsində istifadə edilir (Fəsil 15)

- HER2-yə birləşən və beləliklə EGF ilə verilən siqnalı blok edən monoklonal anticismlər HER2-ni həddən artıq ekspressiya edən süd vəzi şişlərinin müalicəsi üçün sərfəlidir (Fəsil 15)

- Aqonist izoproterenol bronxial saya əzələlərdə epinefrinə-cavab verən reseptorlara epinefrinə nisbətən daha daha möhkəm birləşir, ona görə də, bronxial astmanın, xronik bronxitlərin və emfisemanın müalicəsində istifadə edilir (Fəsil 15)

- Bəzi bakterial toksinlər (məsələn, *Bordetella pertusis*, *Vibrio cholerae*, *E. col*i-nin bəzi kataliz edirştammları) bağırsaq hüceyrələrində G zülalın modifikasiyasını kataliz edir, hüceyrədaxili cAMP-nin miqdarını artırır, o da elektrolitlərin və mayenin itirilməsinə səbəb olur (Fəsil 15)

- Nitroqliserin, stenokardiyanın müalicəsində istifadə edildikdə, ürəyə qan axınını artıran təbii siqnal molekulu olan NO-ya ayrılır (Fəsil 15)

- PDE ingibitorları vazikulyar saya əzələ hüceyrələrində cGMP-ni yüksəldir və erektil disfunksiyanın müalicəsi üçün inkişaf etdirilmişdir (Fəsil 15)

- Çox şişlər ya TGF-β reseptorlarında, ya da Smad zülallarında fəalsızlaşdırıcı mutasiyalara malik olurlar və böyümənin TGF-β tərəfindən ingibirləşməsinə davamlıdırlar (Fəsil 16)

- Epo və G-CSF, müvafiq olaraq böyrək xəstəliyi olan xəstələrdə və sümük iliyində qan hüceyrəsinin əmələ gəlməsinə təsir edən müəyyən bir xərçəngin müalicəsi zamanı qırmızı qan hüceyrələrini və neytrofilləri artırmaq üçün istifadə olunurlar (Fəsil 16)

- Bir çox SCID hadisəsi IL-2 reseptorun qamma zəncirindəki bir çatışmazlıqdan yaranır və gen terapiyası ilə müalicə edilə bilər (Fəsil 16)

- GTP-yə birləşən, amma onu hidroliz edə bilməyən və bu səbəbdən GTP ilə əlaqəli fəal vəziyyətdə olan mutant Ras zülalları onkogen transformasiyaya kömək edirlər (Fəsil 16)

- Raf-ın potent və selektiv inginitorları mutant Raf zülalı tərəfindən yaranan melanoma xəstələrində kliniki sınaqdan keçirilir (Fəsil 16)

- *PTEN* genin bir çox inkişaf etmiş xərçəng tiplərində silinməsi PTEN zülalın itirilməsi ilə nəticələnir, nəzarət olunmayan hüceyrə çoxalmasına səbəb olur (Fəsil 16)

- Aberrant hiperfəal Wnt siqnalın əmələ gətirdiyi sərbəst β-kateninin yüksək səviyyəsi bir çox xərçənglərdə çoxalmanı-təşviq edən genlərin fəallaşması ilə bağlı olur (Fəsil 16)

- Əsas kirpiciklə assosasiyada olan Hh siqnalizasiyanın arzu olunmayan fəallaşması bir sıra şişlərin əmələ gəlməsinə səbəb olur (Fəsil 16)

- ADAM-ların yüksək dərəcədə fəallaşması xərçəngin əmələ gələməsini və ürək xəstəliyinin yaranmasını təşviq edə bilir (Fəsil 16)

- Alzheymer xəstələrin beyni $A\beta_{42}$ peptidlərin aqreqatlarından ibarət olan amiloid lövhələri toplayır (Fəsil 16)

- Şəkərli diabe, qanda qlükoza tənzimlənməsinin pozulması ilə xarakterizə olunur, bu da müalicə edilmədikdə böyük fəsadlara səbəb ola bilər (Fəsil 16)

- İrsi sferositik anemiyalar spektrin, band 4.1 və ankirin-dəki, mutasiyalar nəticəsində yarana bilir (Fəsil 17)

- Düşenne əzələ distrofiyyası distrofin zülalına təsir edir, nəticədə skelet əzələlərinin kəskin zəifləməsinə səbəb olur (Fəsil 17)

- Hipertrofik kardiyomiyopatiyalar ürək yığılması maşını zülallarındakı müxtəlif mutasiyalar nəticəsində yaranır (Fəsil 17)

- Ürək infarktının şiddətini təyin etmək üçün ürək-spesifik troponinlərin səviyyəsini ölçən qan testlərindən istifadə olunur (Fəsil 17)

- Bəzi dərmanlar (məsələn, kolxisin) tubulin dimerlərə birləşərək və onların mikroborucuqlarda polimerləşməsinə mane olur, digərləri isə (məsələn, taksol) mikroborucuqlara birləşərək depolimerləşmənin qarşısını alır (Fəsil 18)

- LIS1-dəki qüsurlar beyinin erkən inkişafında Miller-Dieker lissensefaliyasına səbəb olur və anormallıqlara səbəb olur (Fəsil 18)

Belinin inkişafının erkən dövründə ADPKD və Bardet-Bidel sindromu kimi bəzi xəstəliklər anormallıqların yaranmasına səbəb olur (Fəsil 18)

- ADPKD və Bardet-Biedl sindromu kimi bəzi xəstəliklər ilkin kirpicikdə və qamçıdaxili nəqldə qüsurlarla izlənilmişdir (Fəsil 18)
- Keratin lifləri hüceyrələr arasındakı əlaqələri mexaniki gücləndirərək epiteli toxumalarının quruluş bütövlüyünü qoruyub saxlamaq üçün vacibdir (Fəsil 18)
- İnsanın lamin A genində mutasiyalar laminopatiyalar adlanan geniş müxtəliflikdə xəstəliklərə səbəb olur (Fəsil 18)
- Kohezinopatiyalarda kohezin subvahidlərindəki və ya kohezin yeklənmə faktorların mutasiyalar inkişaf üçün kritik əhəmiyyət kəsb edən genlərin ekspressiyasını qırır, əzaların və kəllə-sifətin (kraniofasiyal) anormallıqları və zəka qüsurları ilə nəticələnir (Fəsil 19)
- Aneoploidiya genlərin səhv tənzimlənməsinə səbəb olur və xərvçəngin inkişafına kömək edə bilir (Fəsil 19)
- Aneoploid yumurtalar əsasən meyoz I-də xromosomların səhv seqreqasiyası nəticəsində və ya ayrılmaması nəticəsində yaranır, döl itirilməsinə və ya Down sindromuna səbəb olur (Fəsil 19)
- CDHR3 zülalı C sinif rinovirusların (RV-C) hava yollarının epiteli hüceyrələrinə birləşməsini, onloarın daxil olmasını və replikasiyasını mümkün edir, nəfəs yollarının xəstəliklərinə və astmanın kəskinləşməsinə səbəb olur (Fəsil20)
- Pemiphigus vulgaris dəri xəstəliyində desmoqlein kadherini autoanticismlərin üstünlük təşkil edən hədəfidir (Fəsil 20)
- Hepatit C virusu və *Vibrio cholerae* bağırsaq bakteriyası kimi bəzi patogenlər sıx qovşaq molekullarını istifadə etmək üçün inkişaf etmişdirlər (Fəsil 20)
- Konneksin genlərində mutasiyalar müxtəlif xəstəliklərin yaranmasına səbəb olur (Fəsil 20)
- Qlomerula bazal membranında qüsurlar böyrək çatışmazlığına səbəb ola bilir (Fəsil 20)
- Askorbatdan məhrum olan hüceyrələrdə pro-α kollagen zəncirləri sağlam qan damarları, vətərlər və dəri üçün lazım olan kollagenin quruluşunun saxlanması üçün kifayət qədər hidroksilləşmir və nəticədə sinqa xəstəliyi əmələ gəlir.
- I tip kollagenə və onunla assosasiyada olan zülallara təsir edən mutasiyalar natamam osteogenez də daxil olmaqla müxtəlif xəstəliklərin yaranmasına səbəb olur (Fəsil 20)
- Çox zaman skelet və ürək-damar anormallıqlarının (məsələn, Marfan sindromu) daxil olduğu xəstəliklər elastik liflərin quruluş zülallarını kodlaşdıran və ya onların düzgün yığılmasına kömək edən zülalları kodlaşdıran genlərin mutasiyaları nəticəsində yaranır (Fəsil 20)
- Hüceyrəxarici matrisa ilə sitoskelet arasındakı bağlantı əzələ distrofiyasında qüsurlu olur (Fəsil 20)
- Leykosit-adgeziya çatışmazlığı genetik qüsurlar nəticəsində əmələ gəlir, nəticədə leykositlərin yoluxmaya qarşı mübarizə qabliyyəti itir, beləliklə bakterial yoluxucuya təkrar tutulma həssaslığı artır (Fəsil 20)
- Transplantasiya olunmuş sümük iliyində sütun hüceyrə funksional qan hüceyrəsinin bütün tiplərini yarada bilir, bu da transplantı müəyyən irsi qan xəstəliyinə malik olan xəstə üçün və eləcə də şüalanma və kemoterapiya almış xırçəng xəstələri üçün faydalı edir (Fəsil 21)
- Bəzi epilepsiya formaları da daxil olmaqla, Kanalopatiya, ion kanallarını kodlaşdıran genlərdə mutasiyalardan yaranır (Fəsil 22)
- Lokal anestezik lidokain, gərginliklə nizamlanan Na^+ kanalı boyunca amin turşusu qalıqlarına birləşərək onu açıq, lakin bağlı vəziyyətdə saxlamaqla işləyir (Fəsil 22)
- Dağınıq sklerozun səbəbi məlum deyil, amma görünür bədənin əsas miyelin zülalı ilə reaksiya verən auto-anticism istehsalını və ya miyelin zülallarını məhv edən proteazların ifrazını əhata edir (Fəsil 22)
- Periferial myelin autoimmun xəstəliklərinin hədəfidir, əsasən P_o-a qarşı anticismlərin yaranmasında iştirak edirlər (Fəsil 22)
- Neyrotransmitterlərin eqzositozunda VAMP-ın əsas rolu botilium toksinin fəaliyyət mexanizmindən görünə bilir (Fəsil 22)
- Neyrotransmitter daşıyıcıları müxtəlif narkotik dərmanların (məsələn, kokainin), eləcə də psixiatriyada tez-ez istifadə edilən müalicə dərmanlarının (məsələn, Prozak, Zoloft, Paxil) hədəfidirlər (Fəsil 22)
- Beyin neyronlarında istehsal olunan nikotin asetilxolin reseptorlar öyrənmə və yaddaşın saxlanılmasında əhəmiyyətlidirlər, bu reseptorların itirilməsi şizofreniyada, epilepsiyada, narkotikadan istifadədə və Alzheymer xəstəliklərində müşahidə edilir (Fəsil 22)
- Tədqiqatlar göstərir ki, gərginliklə nizamlanan Na^+ kanalı Nav1.7 ağrının hiss edilməsində əsas komponentdir (Fəsil 22)
- İnsanlare qoxuya həssaslığına görə çox fərqlənirlər (Fəsil 22)
- Lokalizasiya olunmuş mRNT-lərin sinaptik translyasiyası sinir dövrələrinin əmələ gəlməsi və təcrübəyə ilə bağlı olan plastiklik üçün vacibdir və bu prosesdəki dəyişikliklər sinir sisteminin inkişafı və idrak pozuntuları ilə nəticələnir (Fəsil 22)
- İmmunosupressant dərman tsiklosporin tsikloporin-tsiklofillin kompleksinin yaranması ilə kalsineyronun fəallığının ingibirləşdirir, beləliklə uğurlu allogen toxuma transplantasiyasına imkan yaradır (Fəsil 23)
- Peyvəndlər müxtəlif patogenlərə qarşı immunitet toxunulmazlığı yaradırlar (Fəsil 23)
- Şişlərin molekulyar hüceyrə biologiyası haqqında anlayışların getdikcə artması xərçənglərin diaqnozu və müalicəsi yolunda inqilab yaradır (Fəsil 24)

Bitki biologiyası əlaqələri

Kənd təsərrüfatının, ətraf mühit elminin və alternativ enerji istehsalındakı inkişaflar göstərdi ki, bitkilərin molekulyar-hüceyrə biologiyası bizim həyatımız üçün getdikcə daha çox aktual olur. Fotosintezin və xloroplastların anlaşılması bitki biologiyasının yalnız başlanğıcıdır. Bütün mətn boyu biz, bitkilər üçün unikal olan hüceyrə quruluşu və funksiyasının aspektləri, bitkilərin inkişafı, kənd təsərrüfatı və təbabətdəki problemlərin həllinə yönəldilmiş bitki biotexnologiyasındakı tətbiqlər də daxil olmaqla bitkilərə spesifik olan mövzuları vurğuladıq.

- Vazikulyar (damarlı) bitkilər sərt hüceyrə divarlarına malikdir və dik durmaq və böyümək üçün turgor təzyiqindən istifadə edirlər (Fəsil 11)
- Vakuol Na^+/H^+ antiporterini yüksək dərəcədə ekspressiya edən transgen bitkilər istehsal edilmişdir və buna görə də yüksək duz qatılığı olan torpaqlarda uğurla bitə bilirlər (Fəsil 11)
- Mitoxondrial RNT transkriptin redaktəsi sitozin qalıqlarını urasil qalıqlarına çevirə bilir (Fəsil 12)
- Fotosintez ATP sintezi üçün çox mühüm bir prosesdir (Fəsil 12)ətən cavan
- Xloroplast DNT-ləri təkamülcə mitoxondrial DNT-lərə nisbətəndır və daha az quruluş müxtəlifliyinə uğramışlar (Fəsil 12)
- Xloroplast transformasiyası yoluxmalara qarşı dözümlü olan birkilərin və eləcə də zülal dərmanların istehsalı üçün yararlı olan bitkilərin yaranmasına səbəb olmuşdur (Fəsil 12)
- *Nitella* kimi nəhəng yaşıl yosunlarda myozin V-in istifadəsinə görə sürətlə axır (Fəsil 17)
- Şpindelin və sitokinezin formalaşması bitkilərdə unikal xüsusiyyətlərə malikdir (Fəsil 12)
- Meristemlər bitkilərdə sütun hüceyrələr üçün nişadır (Fəsil 21)
- Mənfi geriyə əlaqə ilgəyi gövdənin apikal-sütun hüceyrə populyasiyasının ölçüsünü saxlayır (Fəsil 21)
- Kök meristemi quruluşuna və funksiyasına görə gövdə meristeminə bənzəyir (Fəsil 21

Mündəricat qısa

I cild

I hissə Kimyəvi və molekulyar əsaslar

1 Molekullar, Hüceyrələr və Model Orqanizmlər
2 Kimyəvi Əsaslar
3 Zülalların Quruluşu və Funksıyası
4 Hüceyrələrin Kulturası və Vizuallaşdırılması

II hissə Biomembranlar, Genlər və Gen Tənzimlənməsi

5 Fundamental Molekulyar Genetik Mexanizmlər
6 Molekulyar Genetik Metodlar
7 Biomembranların Quruluşu
8 Genlər, Genomlar və Xromosomlar
9 Genlərin Ekspressiyasına Transkipsiya Səviyyəsində Nəzarət
10 Post-transkripsiya Gen Nəzarəti

III Hissə Hüceyrənin Təşkili və Fəaliyyəti

11 İonların və Kiçik Molekulların Transmembran Daşınması
12 Hüceyrə Energetikası

II cild

13 Zülalların Membranlara və Orqanoidlərə Keçirilməsi
14 Qovucuqlarla Daşınma, İfrazat və Endositoz
15 Siqnal Ötürülməsi və G Zülallarla-Cütləşən Reseptorlar
16 Gen Ekspressiyasına Nəzarət Edən Siqnal Yolları
17 Hüceyrənin Təşkili, Hərəkəti I: Mikrofilamentlər
18 Hüceyrənin Təşkili və Hərəkəti II: Mikroborucuqlar və Aralıq Filamentlər
19 Eukaryotik Hüceyrə Tsikli

IV Hissə Hüceyrənin Böyüməsi və Differensasiyası

20 Hüceyrələrin Toxumalarda inteqrasiyası
21 Sütun Hüceyrələr, Hüceyrə Assimetriyası, Hüceyrə Ölümü
22 Sinir Sistemi Hüceyrələri
23 İmmunologiya
24 Xərçəng

Mündəricat detalları ilə I cild

I hissə Kimyəvi və molekulyar əsaslar

1 Molekullar, Hüceyrələr və Model Orqanizmlər 33

1.1 Həyat molekulları 36

Zülallar Hüceyrəyə Quruluş Verir və Əksər Hüceyrə Tapşırıqlarını Həyata Keçirir **39**

Nuklein Turşuları Lazım Olan Zamanda və Lazım Olan Yerdə Zülalı Istehsal Etmək Üçün Kodlaşdırılmış Informasiyanı Daşıyırlar **39**

Fosfolipidlər Bütün Hüceyrə Membranlarının Konservativ Quruluş Bloklarıdır **41**

1.2 Prokariot Hüceyrələr Quruluşu və Funksiyası 42

Prokariotlar Iki Aləmdən Təşkil Olunublar: Arxealar və Eubakteriyalar **42**

Escherichia coli Bioloji Tədqiqatlarda Geniş İstifadə Olunur **43**

1.3 Eukariot Hüceyrələr Quruluşu və Funksiyası 45

Sitoskeletin Çoxsaylı Əhəmiyyətli Funksiyası Vardır **45**

Nüvə DNT Genomuna, RNT Sintezi Aparatına və Fibroz Matrisaya Malikdir **46**

Eukariot Hüceyrələr Böyük Sayda Daxili Membran Quruluşlara Malikdirlər **48**

Mitoxondri Aerob Hüceyrələrdə ATP İstehsalının Əsas Saytıdır **49**

Xloroplastlar Fotosintezin Baş Verdiyi Daxili Kompartmenti Əmələ Gətirir **50**

Bütün Eukariot Hüceyrələr Bölünmələrini Tənzimləmək Üçün Oxşar Tsikldən İstifadə Edirlər **51**

1.4 Birhüceyrəli Eukariotik Model Orqanizmlər 51

Maya Hüceyrələri Eukariotik Hüceyrələrin Funksiyalarının və Quruluşlarının Fundamental Aspektlərinin Öyrənilməsində İstifadə Olunurlar **52**

Mayada Aparılan Mutasiyalar Əsas Hüceyrə Tsikli Zülallarının İdentifikasiyasına Səbəb Oldu **52**

Chlamydomonas reinhardtii Yosunu Beyinin Funksiyasını Öyrənmək üçün Güclü Metodun Yaranmasına Səbəb Oldu **54**

Malariyanın Yaranmasına Səbəb Olan Parazitlərdə Onların Əhəmiyyətli Həyat Tsiklinin Keçməsinə İmkan Verən Yeni Orqanoidlər Vardır **55**

1.5 Çoxhüceyrəlilərin Quruluşu, Differensasiyası və Model Orqanizmlər 6

Çoxhüceyrəlilik Hüceyrə-Hüceyrə və Hüceyrə-Matrisa Adgeziyasını Tələb Edir. **56**

Epiteli Təkamülün Erkən Dövründə Yaranmışdır **56**

Toxumalar Orqanlarda Təşkil Olunurlar **56**

Genomiks Metazoan Təkamülünün və Hüceyrə Funksiyasının Əhəmiyyətli Aspektlərini Aşkar Etdi **57**

Embrional İnkişaf Master Transkripsiya Faktorlarının Konservativ Dəstindən İstifadə Edir **58**

Planari Sütun Hüceyrələrin və Toxuma Regenerasiyasının Tədqiqində İstifadə Olunur **60**

Onurğasızlar, Balıq, Siçan və Başqa Orqanizmlər Insanın Inkişafının Öyrənilməsində və Xəstəliklərin Tədqiqində Eksperimental Sistemlər Kimi Istifadə Olunur **60**

Genetik Xəstəliklər Hüceyrə Funksiyasının Əhəmiyyətli Aspektlərini İzah Edir **61**

Növbəti Fəsillər, Hüceyrənin Quruluşu və Funksiyası Haqqında Bizim Necə Bilməyimizi və Nəyi Bilməyimizi İzah Edən Daha Çox Eksperimental Verilənləri Təqdim Edir **61**

2 Kimyəvi Əsaslar 63

2.1 Kovalent Rabitələr və Qeyri-kovalent Qarşılıqlı Təsir 64

Atomun Elektron Quruluşu Onun Edə Biləcəyi Kovalent Rabitənin Geometriyasının Sayını Təyin Edir **65**

Elektronlar Kovalent Rabitələrdə Bərabər və Qeyri-bərabər Paylaşa bilərlər **66**

Kovalent Əlaqələr Qeyri-Kovalent Əlaqələrə Nisbətən Daha Möhkəm və Sabitdirlər **67**

İon Əlaqələri Əks Yüklənmiş İonlar Arasında Cazibədir **68**

Hidrogen Rabitələri Yüksüz Molekulların Suda Həllolma Qabliyyətini Müəyyən Edən Qeyri-kovalent Əlaqələrdir **69**

Van der Vaals Qarşılıqlı Əlaqələri Keçici Dipollar Tərəfindən Yaranmış Zəif Cazibə Əlaqələridir **70**

Hidrofob Təsir Qeyri-Polyar Molekulların Bir-Birinə Birləşməsinə Səbəb Olur **70**

Qeyri-kovalent Qarşılıqlı Təsir Nəticəsində Molekulyar Komplementarlıq Biomolekullar Arasında Kilid və Açar Uyğunluğunu Əmələ Gətirir **71**

2.2 Hüceyrənin Kimyəvi Quruluş Blokları 73

Yalnız Yan Zəncirinə Görə Fərqlənən Amin Turşuları Zülalları Təşkil Edirlər **74**

Beş Müxtəlif Nukleotid Nuklein Turşularının Qurulmasında İstifadə Olunur **76**

Monosaxaridlər Xətti Və Şaxələnmiş Polisaxaridlərdə Kovalent Toplanırlar **77**

Biomembranların Ikiqat Quruluşunu Yaratmaq Üçün Fosfolipidlər Qeyri-kovalent Birləşirlər **79**

2.3 Kimyəvi Reaksiyalar və Kimyəvi Tarazlıq 82

Düzünə və Geriyə Reaksiyaların Sürəti Bərabər Olanda Kimyəvi Reaksiyalar Tarazlıqda Olur **82**

Tarazlıq Konstantı Kimyəvi Reaksiya Dərəcəsini Əks Etdirir **83**

Hüceyrələrdə Kimyəvi Reaksiyalar Sabit Vəziyyətdədir **83**

Birləşmə Reaksiyalarının Dissosasiya Konstantı Qarşılıqlı Təsirdə Olan Molekulların Affinliyinda Əks Olunur **84**

Bioloji Məhlullar Xarakterik pH Qiymətinə Malikdirlər **85**

Hidrogen İonları Turşularla Buraxılır və Qələvilərlə Tutulur **85**

Buferlər Hüceyrədaxili və Hüceyrəxarici Mayelərdə pH-ı Saxlayır **86**

2.4 Biokimyəvi Energetika 87

Enerjinin Bir neçə Forması Bioloji Sistemlər Üçün Əhəmiyyətlidir **88**

Hüceyrələr Bir Tip Enerjini Digərinə Çevirə Bilirlər **88**

Sərbəst Enerjidəki Dəyişiklik Kimyəvi Reaksiyaların Spontan Baş Verəcəyini Təyin Edir **89**

Reaksiyanın $\Delta G^{o\prime}$-i Onun K_{eq}-dən Hesablana Bilər **90**

Reaksiyanın Sürəti Reagentləri Keçici Vəziyyətə Gətirmək Üçün Lazım Olan Fəallaşma Enerjisindən Asılıdır **90**

Həyat Energetik Cəhətdən Əlverişli Olmayan Kimyəvi Reaksiyaların Əlverişli Reaksiyalarla Birləşməsindən Asılıdır **91**

ATP-nin Hidrolizi Əhəmiyyətli Dərəcədə Sərbəst Enerjini Ayırır və Çoxsaylı Hüceyrə Proseslərini İdarə Edir **92**

ATP Fotosintez və Tənəffüs zamanı Yaranır **93**

NAD^+ və FAD Çoxsaylı Bioloji Oksidləşmə və Reduksiya Reaksiyaları ilə Birləşir **93**

3 Zülalların Quruluşu və Funksıyası 97

3.1 Zülalların Quruluşunda Ierarxiya 99

Zülalların Birinci Quruluşu Amin Turşusu Ardıcıllığının Xətti Düzülüşüdür **99**

İkinci Qururluş Zülal Arxitekturasının Əsas (Core) elementləridir **100**

Üçüncü Quruluş Polipeptid Zəncirin Ümumi Bükülməsidir **102**

Zülalların Geniş Yayılmış Dörd Quruluş Kateqoriyas Var **103**

Zülalların Konformasiyasını Təsvir Etməyin Fərqli Yolları Fərqli İnformasiya Tiplərini Verir **104**

Quruluş Motifləri İkinci Quruluşun Müntəzəm Kombinasiyasıdır **105**

Domenlər Üçüncü Quruluşun Modullarıdır **107**

Çoxsaylı Polipeptidlər Dördüncü Quruluşda və Supermolekulyar Komplekslərdə Toplanırlar **107**

Zülalın Ardıcıllığının və Quruluşunun Müqayisəsi Zülalların Funklsiyasını və Təkamülinü Anlamağı Təmin Edir **108**

3.2 Zülalların Bükülməsi 111

Planar Peptid Əlaqələri Zülalların Bükülə Biləcəyi Formanı Məhdudlaşdırır **111**

Zülalın Amin Turşu Ardıcıllığı Onun Necə Büküləcəyini Təyin Edir **111**

Zülalların in vivo Bükülməsi Çaperonlarla Təşviq Olunur **112**

Zülal Bükülməsi Prolin İzomeraza ilə Təşviq Olunur **117**

Anormal Bükülmüş Zülallar Xəstəliklərin yaranmasında İşrirak Edirlər **117**

3.3 Zülalın Birləşməsi və Fermentativ Kataliz 119

Liqandların Xüsusi Birləşməsi Zülalların Çoxunun Funksiyasının Əsasıdır **119**

Fermentlər Olduqca Səmərəli Katalizatorlardır **120**

Fermentin Fəal Mərkəzi Substrata Birləşərək Kataliz Prosesini Aparır **121**

Serin Proteazalar Fermentin Fəal Mərkəzlərinin Necə Işlədiyini Nümayiş Etdirirlər **123**

Ümumi Yolun Fermentləri Çox Vaxt Biri-biri ilə Fiziki Bağlı Olurlar **126**

3.4 Zülalların Funksiyasının Tənzimlənməsi 128

Zülalların Sintezinin və Parçalanmasının Tənzimlənməsi Hüceyrələrin Fundamental Xassəsidir **128**

Proteasom Zülalların Parçalanması Üçün Istifadə Olunan Molekulyar Maşındır **128**

Ubikvitin Sitozolda Zülalları Proteasomlarda Parçalanmaq Üçün Nişanlayır **130**

Qeyri-kovalent Birləşmələr Zülalların Kooperativ və ya Allosterik Ttənzimlənməsinə İmkan Verir **131**

Kalsium və GTP-nin Qeyri Kovalent Birləşməsi Zülalların Fəallığına Nəzarətdə Allosterik Keçiricilər Kimi Geniş İstifadə Olunur **132**

Fosforlaşma və Defosforlaşma (Fosforsuzlaşma) Zülalların Fəallığını Kovalent Tənzimləyir **134**

Ubikvitinləşmə və Deubikvitinləşmə Zülalların Fəallığını Kovalent Tənzimləyir **134**

Proteolitik Kəsilmələr Bəzi Zülalları Geriyə Dönməyən Şəkildə Fəallaşdırır və ya Dayandırır **136**

Zülalların Yerləşməsinə Nəzarət Olunması Yüksək-Dərəcədə Tənzimlənməyə Aiddir **136**

3.5 Zülalların Təmizlənməsi, Aşkar Edilməsi və Xarakterizə Olunması 137

Sentrifuqada Fırlatma Kütləsinə və Sıxlığına Görə Fərqlənən Zərrəcikləri və Molekulları Ayıra Bilir **137**

Elektroforez Molekulları Onların Yükün-Kütləyə Olan Nisbətinə Əsasən Ayırır **139**

Maye Xromotoqrafiya Zülalları Kütləsinə, Yükünə, və ya Affinliyinə Görə Ayırır **141**

Yüksək Spesifikli Ferment və Anticismlə Sınaqlar Fərdi Zülalları Tapmağa Imkan Verir **143**

Radioizotoplar Bioloji Molekulların Təyin Olunmasında Əvəzolunmaz Üsullardır **144**

Mass Spektrometriya Zülalların Kütləsini və Ardıcıllıqlarını Təyin Edə Bilir **147**

Zülalların İlkin Quruluşu Kimyəvi Metodla və Genin Ardıcıllığına Əsasən Təyin Oluna Bilər **150**

Zülalların Konformasiyası Daha Mükəmməl Fiziki Metodlarla Təyin Edilir **150**

3.6 Proteomiks 154

Proteomiks Zülalların Hamısının və ya Əksər Çoxluğunun Bioloji Sistemlərdə Tədqiqidir **154**

Mass Spektrometriyanın Qabaqcıl Metodları Proteomik Analizləri Üçün Kritik Əhəmiyyətlidir **154**

4 Hüceyrələrin Kulturası və Vizuallaşdırılması 160

4.1 Hüceyrələrin Kulturada Artırılması və Öyrənilməsi 161

Hevan Hüceyrələrinin Kulturası Zəngin-Qidalanma Mühitini və Xüsusi Bərk Səthi Tələb Edir **161**

İlkin Hüceyrə Kulturaları və Hüceyrə Ştammları Məhdud Həyat Tsiklinə Malikdirlər **162**

Tansformasiya Olunmuş Hüceyrələr Kulturada Sonsuz Dərəcədə Çoxala Bilirlər **163**

Axın Sitometriya Müxtəlif Hüceyrə Tiplərini Ayırır **163**

İki-Ölçülü və Üç-Ölçülü Kulturada Hüceyrələrin Inkişafı In Vivo Mühiti Əks Etdirir **164**

Hibridomalar Zəngin Monoklonal Anticismləri Yaradırlar **165**

Geniş Müxtəliflikdə Hüceyrə Biologiyası Prosesləri Kultura Olunan Hüceyrələrlə Öyrəlinə Bilər **167**

Hüceyrə Biologiyası Tədqiqatlarında Çox İstifadə Olunan Dərmanlar **168**

4.2 İşıq Mikroskopu: Hüceyrə quruluşunun Tədqiqi və Zülalların Hüceyrə Daxilində Aşkar Olunması 170

İşıq Mikroskopunun İmkanı 0.2 μm Yaxındır **170**

Faza-Kontrast və Differensial-İnterferensiya-Kontrast Mikroskopiya Rənglənməmiş Hüceyrələri Vizuallaşdırır **171**

Subhüceyrə Detallarının Təsvirinin Alınması Çoxzaman Tələb Edir ki, Nümunələr Fiksasiya Olunsun, Hissələrə Bölünsün və Rənglənsin **173**

Fluoressent Mikroskopiya Canlı Hüceyrələrdə Spesifik Molekulları Lokalizasiya və Miqdarca Təyin Edə Bilir **173**

Hüceyrədaxili Iion Qatılıqları İona-Həssas Fluoressent Boyalarla Təyin Ediə Bilər **173**

İmmunofluoressensiya Mikroskopiyası Fiksə Olunmuş Hüceyrələrdə Spesifik Zülalları Aşkar Edə Bilir **175**

Fluoressent Zülallarla Yarlıklama Canlı Hüceyrələrdə Spesifik Zülalların Vizuallaşdırılmasına İmkan Verir **176**

Dekonvolusiya və Konfokal Mikroskopiya Fluoressent Obyektlərin Üç-Ölçülü Vizuallaşdırılmasını Gücləndirir **177**

TIRF Mikroskopiya Bir Fokus Müstəvisində Müstəsna Təsvirləri Verir **180**

FRAP Hüceyrə Komponentlərinin Dinamikasını Aşkar Edir **182**

FRET Xromoforlar Arasında Məsafəni Ölçür **183**

Super-Rezolyusiyalı Mikroskopiya Zülalların Yerləşməsini Nanometr Dəqiqliklə Aşkar Edəbilir **184**

İşıq-Təbəqə Mikroskopiyası Hüceyrələri Canlı Toxumada Tez Şəkildə Təsvir Edir **185**

4.3 Elektron Mikroskopu: Yüksək Keyfiyyətli (Rezolyusiyalı) Görüntüləmə 188

Tək Molekullar və ya Quruluşlar Mənfi (Neqativ) Rəngləmə və ya Metal Kölgələmədən İstifadə etməklə Təsvir Oluna Bilir **188**

Hüceyrə və Toxumalar Elektron Mikroskopiyasında Baxmaq Üçün Nazik Kəsiklərə Ayrılır **188**

İmmunoelektron Mikroskopiyası Zülalların Yerini Ultraquruluş Səviyyəsində Aşkar Edir **189**

Krioelektron Mikroskopiya Nümunələri Fiksasiya Olunmadan və Rənglənmədən Vizuallaşdırmağa İmkan Verir **190**

Metalla Örtülmüş Nümunənin Skanedici Elektron Mikroskopiyası Səth Xüsusiyyətlərini Aşkar Etdi **191**

4.4 Hüceyrə Orqanoidlərinin Ayrılması 193

Hüceyrənin Dağıdılması Orqanoidləri və Başqa Tərkib Hissələrini Azad Edirr **190**

Sentrifuqalaşdırma Çoxsaylı Müxtəlif Tipli Orqanoidləri Ayıra Bilir **194**

Orqanoid-Spesifik Anticismlər Yüksək Təmizlənmiş Orqanoidlərin Hazırlanmasında Faydalıdırlar **194**

Proteomiks Orqanoidlərin Zülal Tərkibini Aşkar Edir **196**

II Hissə Biomembralar, Genlər və Gen Tənzimlənməsi

5 Fundamental Molekulyar Genetik Mexanizmlər 198

5.1 Nuklein turşularının quruluşu 201

Nuklein Turşusu Zəncirləri Ucdan-Uca Ynəlmiş Xətti Polimerdir **201**

Nativ DNT komplementar antiparalel zəncirlərin yaratdığı ikiqat spiraldır **201**

DNT Geriyə Dönən Zəncir Ayrılmasına Uğraya Bilir **203**

DNT-də Torsional Stress Fermentlər Vasitəsilə Buraxılır **205**

Müxtəlif Tipli RNT-lər Öz Funksiyalarına Uyğun Olaraq Fərqli Konformasiyaları Yaradırlar **205**

5.2 Zülal-kodlaşdıran genlərin transkripsiyası və funksional mRNT-nin formalaşması 207

Templeyt DNT Zəncir RNT Polimeraza Vasitəsi ilə Komplementar RNT Zəncirinə Transkripsiya Olunur **208**

Prokariot və Eukariot DNT-də Genlərin Düzülüşü Fərqlənir **210**

Eukariot Sələf mRNT-lər Funksional mRNT-ləri Əmələ Gətirmək üçün Prosessing Olunurlar **211**

Alternativ RNT Splaysinqi Vahid Eukariotik Gendən Sintez Olunan Zülalların Sayını Artırır **212**

5.3 mRNT kodlarının tRNT ilə açılması 214

Məlumat RNT İnformasiyanı DNT-dən Üç-Hərfli Genetik Kod Şəklində Daşıyır **215**

tRNT-nin Bükülmüş Quruluşu Onun Kod Oxuma Funksiyasını Artırır **216**

Kodon və Antikodon Arasında Tez-tez Qeyri Standart Əsas Cütləri Əmələ Gəlir **217**

Amin Turşuları tRNT-lərə Kovalent Rabitə ilə Birləşdikdə Fəallaşmış Olurlar **219**

5.4 Zülalların ribosomlarda mərhələli sintezi 220

Ribosomlar Zülal Sintez Edən Maşındır **220**

Metionil-$tRNT_i^{Met}$ AUG Start Kodonunu Tanıyır **222**

Eukariotlarda Translyasiyanın Inisiasiyası Adətən mRNT-nin 5′ Sonluğuna Yaxın Olan İlk AUG Kodonunda Baş Verir **222**

Zəncirin Elonqasiyası Zamanı Gələn Hər Bir Aminoasil-tRNT Üç Ribosomal Saytdan Keçir **224**

Stop Kodona Çatdıqda Translyasiya Riliz Faktorla Dayandırılır **226**

Polisomlar və Ribosomların Sürətli Təkrar İstifadəsi Translyasiyanın Effektivliyini Artırır **227**

GTPaza Superailəsinə Daxil Olan Zülallar Translyasiyanın Keyfiyyətə Nəzarət Mərhələlərində Fəaliyyət Göstərir **227**

Nonsens Mutasiya Zülal Sintezini Vaxtından Əvvəl Dayandırır **228**

5.5 DNT-nin replikasiyası 229

Replikasiyanın İnisiasiyası Üçün DNT Polimeraza Praymer Tələb Edir **230**

DNT-nin İkiqat Zənciri Açılır və DNT Replikasiya Çəngəlində Qız Zəncirlər Formalaşır **230**

DNT Replikasiyasında Bir-sıra Zülallar İştirak Edir **230**

Hər Mənşədən DNT Replikasiyası İki İstiqamətə gedir **231**

5.6 DNT-nin reparasiyası və rekombinasiyası 234

DNT Polimerazalar Köçürmələrdə Səhvlər Buraxır və Onları Düzəldir **234**

DNT-də Kimyəvi və Radiasiya Zədələnmələri Mutasiyalar Yarada Bilir **235**

Yüksək Dəqiqlikli DNT Kəsilməsi-Reparasiya Sistemləri Zədələri Tanıyıb Bərpa Edir **236**

Əsasların Kəsilməsi T-G Uygunsuzluğunu və Zədələnmiş Əsasları Təmir Edir **236**

Uyğun Olmayanın Kəsilməsi Digər Uyğun Olmayanları, Kiçik İnsersiyaları və Delesiyaları Bərpa Edir **237**

Nukleotidlərin Kəsilməsi Kimyəvi Maddələrin Təhrif Etdiyi Normal DNT Formasını Bərpa Edir **237**

İki Sistem Rekombinasiya Yolu İlə DNT-də İki-Zəncirli Qırılmaları Bərpa Edir **239**

Homoloji Rekambinasiya DNT Zədələnmələrini Bərpa Edir və Genetik Müxtəlifliyi Yaradır **240**

5.7 Viruslar: Hüceyrənin genetik sisteminin parazitləri 244

Əksər Virusların Sahib Orqanizm Sırası Məhduddur **244**

Virus Kapsidləri Bir və ya Bir Neçə Tip Zülallar Sırasından İbarətdir **246**

Viruslar Klonlaşdırıla və Lövhə (Plaque) Sınaqlarında Sayıla Bilər **246**

Litik Virus Artma Dövrələri Sahib-Hüceyrələrin Ölümünə Səbəb Olur **246**

Qeyri Litik Virus Artma Dövrəsində Virus DNT Sahib Hüceyrələrinin Genomuna İnteqrasiya Edir **247**

6 Molekulyar Genetik Metodlar 254

6.1 Genlərin Öyrənilməsi və İdentifikasiyasında Mutasiyaların Genetik Analizi 255

Genlərin Funksiyasında Resessiv və Dominant Mutant Allellər Əsasən Əks Təsirə Malik Olurlar **256**

Seleksiya Eksperimentlərində Mutasiyanın Seqreqasiyası Onların Dominantlığını və ya Resessivliyini Aşkar Edir **257**

Şərti Mutasiyalar Mayada Əhəmiyyətli Genlərin Öyrənilməsində Istifadə Oluna Bilər **257**

Diploidlərdə Resessiv Letal Mutasiyalar Inbridinq Yolu İlə Identifikasiya Oluna Bilər və Heteroziqotlarda Qorunub Saxlanıla Bilər **260**

Komplementasiya Testləri Eyni Gendə Müxtəlif Resessiv Mutasiyaların Olduğunu Təyin Edir **261**

İkiqat Mutantlar Zülalların Fəaliyyətinin Ardıcıllığını Qiymətləndirmək Üçün Əhəmiyyətlidir **261**

Genetik Supressiya və Sintetik Letallıq Qarşılıqlı Təsirdə Olan və ya Lazımsız Zülalları Aşkar Edə Bilir **262**

Genlər Onların Xromosomdakı Xəritələnmiş Vəziyyətinə Görə Identifikasiya Oluna Bilərlər **263**

6.2 DNT-nin klonlaşdırılması və Xəritələşdirilməsi 265

Restriksiya fermentləri və DNT liqazalar DNT fraqmentlərinin klonlaşdırma vektorlarına keçirilməsinə imkan yaradır **266**

Ayrılmış DNT Fraqmentləri *E.coli* Plazmid Vektorlarına Klonlaşdırıla bilər **267**

Maya Genom Kitabxanaları Şatl Vektorla Qurula və Funksional Komplementasiya Vasitəsilə Ekranlaşdırıla bilər **269**

kDNT Kitabxanaları Zülal-Kodlaşdıran Genlərin Ardıcıllığını Təmsil Edir **270**

Polimeraza Zəncirvari Reaksiyası Xüsusi DNT ardıcıllığını Kompleks Qatışıqdan Amplifikasiya Edir **271**

Klonlaşmış DNT Molekullarının Ardıcıllığı PZR-ə Əsaslanan Metodlarla Tez Oxuna Bilər **275**

6.3 Genlərin Ekspressiyasının Öyrənilməsində Klonlaşdırılmış DNT Fraqmentinin İstifadə Olunması 278

Hibridləşmə Metodları Spesifik DNT Fraqmentlərinin və mRNT-lərin Təyin Olunmasına İmkan Verir **278**

DNT Mikroarrey Çox Genlərin Ekspressiyasının Bir Dəfəyə Qiymətləndirilməsində Istifadə Oluna Bilər **279**

Çoxsaylı Ekspressiya Eksperimentlərindəki Klaster Analizləri Ko-tənzimlənən Genləri Müəyyən Edir **280**

E. coli Ekspressiya Sistemi Klonlaşdırılmış Gendən Böyük Miqdarda Zülalları İstehsal Edə bilir **281**

Plazmid Ekspressiya Vektoru Heyvan Hüceyrələrində Istifadə Üçün Dizayn Oluna Bilər **282**

6.4 Insan Xəstəliyi Genlərinin Müəyyənləşdirilməsi və Yerinin Təyini 285

Monogen Xəstəliklər İrsiyyətin Üç Profilindən Birini Göstərir **286**

DNT Polimorfizmlər İnsan Mutasiyalarında Əlaqələrin-Xəritələşdirməsində Markerlər Kimi İstifadə Olunur **287**

Bağlantı Tədqiqatları Xəstəlik Genlərinin 1 Sentimorqan Rezolyudiyalı Xəritəsini Yarada Bilir **288**

Klonlaşdırılmış DNT-də Xəstəlik Geninin Yerini Tapmaq Üçün Əlavəı Analizlər Lazımdır **289**

Çox İrsi Xəstəliklər Bir Çox Genetik Qüsurun Nəticəsidir **289**

6.5 Eukariotlarda Xüsusi Genlərin Funksiyasının Dayandırılması 291

Normal Maya Geni Homoloji Rekombinasiya Yolu ilə Mutant Allellə Əvəz Oluna Bilir **292**

Genlər Eksperimental Tənzimlənən Promotorun Nəzarəti Altında Yrləşdirilə Bilir **292**

Xüsusi Genlər Siçanın Rüşeyim Xəttində Birdəfəlik Fəalsızlaşdırıla Bilər **293**

Somatik Hücyrə Rekombinasiyası Spesifik Toxumalarda Genləri Fəalsızlaşdıra Bilir **294**

Dominant-Neqativ Allellər Bəzi Genləri Funksionaol İngibirləşdirə Bilir **294**

Müdaxilə RNTsi Müvafiq mRNT-ni Dağıtmaqla Genlərin Fəalsızlaşmasına Səbəb Olur **295**

Yaradılmış CRISPR-Cas9 Sistemlər Dəqiq Genom Redaktəsinə İmkan Verir **298**

7 Biomembranların Quruluşu 303

7.1 Lipid ikiqatlısı: Tərkibi və Quruluşunun Təşkili 304

Fosfolipidlər Ikiqatlılnı Spontan Şəkildə Əmələ Gətirirlər **305**

Fosfolipid İkiqatlısı Daxili Su Mühitini Əhatə Edən Germetik Kompartmenti Yaradır **306**

Biomembranlar Üç Əsas Lipid Sinifinə Malikdirlər **308**

Lipidlərin Əksəriyyəti və Çox Zülallar Biomembranlarda Lateral Hərəkətdədirlər **309**

Lipid Tərkibi Membranların Fiziki Xassəsinə Təsir Edir **311**

Eqzoplazmatik və Sitozol Vərəqlədə Lipid Tərkibi Müxtəlifdir **313**

Xolesterin və Sfinqolipidlər Membran Mikrodomenlərində Spesifik Zülallarla Klaster Əmələ Gətirirlərr **314**

Hüceyrələr Artıq Lipidləri Lipid Damlalarda Saxlayırlar **315**

7.2 Membran Zülalları: Quruluşu və Əsas Fəaliyyətləri 316

Zülallar Membranlarla Üç Müxtəlif Yolla Qarşılıqlı Əlaqədə Olurlar **316**

Transmembran Zülalların Əksəriyyəti Membrana-Sarılmış α Spirallara Malik Olurlar **317**

Porinlərdə Çoxsaylı β Zəncirlər Membrana-Sarınmış "Barrelləri" (Çəlləkləri) Yradırlar **319**

Kovalent Birləşmiş Lipidlər Bəzi Zülalları Membrana Bağlayır **320**

Bütün Transmembran Zülallar və Qlikolipidlər İkiqatlıda Asimmetrik Yönəlmişlər **321**

Lipid-Birləşdirən Motiflər Periferial Zülalları Membrana Hədəf Etməyə Kömək Edir **322**

Zülallar Membrandan Detergentlərlə və ya Yüksək-Duz Məhlulu Ilə Ayırıla Bilir **322**

7.3 Fosfolipidlər, Sfinqolipidlər və Xolesterin: Sintezi və Hüceyrədaxili Hərəkıtləri 325

Yağ Turşuları Birsıra Əhəmiyyətli Fermentlər Vasitəsilə İki-Karbonlu Qurulma Bloklarından Yığılırlar **325**

Kiçik Sitozol Zülalları Yağ Turşularının Hərəkətinə Şərait Yaradırlar **326**

Yağ Turşuları Əsasən ER Membranlarında Fosfolipidlərə Birləşirlər **326**

Flippazalar Fosfolipidləri Bir membran Vərəqəsindən Əks Tərəfdəkinə Köçürə Bilirlər **327**

Xolesterin Sitozolda və ER Membranında Fermentlərlə Sintz Olunur **327**

Xolesterin və Fosfolipidlər Orqanoidlər Arasında Bir Sıra Mexanizmlərlə Daşınırlar **328**

8 Genlər, Genomlar və Xromosomlar 332

8.1 Eukariotik Genin Quruluşu 334

Eukariot Genlərin Əksəriyyəti İntronlara Malik Olurlar və Bir Zülalı Kodlaşdıran mRNT-ləri Yaradırlar **334**

Eukariotik Genomlarda Sadə və Kompleks Transkripsiya Vahidləri Tapılmışdır **334**

Zülal Kodlaşdıran Genlər Tək-tək Ola Bilirlər və ya Gen Ailəsinə Mənsub Olurlar **336**

Çox İstifadə Olunan Gen Məhsulları Genlərin Çoxsaylı Nüsxələri Tərəfindən Kodlaşdırılır **338**

Zülal Kodlaşdırmayan Genlər Funksional RNT-ləri Kodlaşdırırlar **339**

8.2 Genlərin və Kodlaşdırılmayan DNT-nin Xromosomda Təşkili 340

Çox Orqanizmlərin Genomu Qeyri-funksional DNT-yə Malikdir **340**

Sadə Ardıcıllıqlı DNT-lərin Əksəriyyəti Spesifik Xromosom Nahiyyələrində Cəmlənmişdir **341**

DNT Finqerprintinqi Sadə Ardıcıllıqlı DNT-lərin Uzunluğundakı Fərqlərdən Asılıdır **342**

Təsnifləşdirilməmiş Genlərarası DNT Genomun Kifayət Qədər Böyük Hissəsini Tutur **343**

8.3 Transpozon (Mobil) DNT Elementləri 344

Mobil Elementlərin Keçirilməsinə DNT və ya RNT Aralıq Məhsulları Daxildirlər **345**

DNT Transpozonlar Eukariotlarda və Prokariotlarda Mövcuddurlar **345**

LTR Retrotranspozonlar Özlərini Hüceyrədaxili Retroviruslar Kimi Aparırlar **347**

Qeyri-LTR Retrotranspozonlar Birbaşa Mexanizmlə Keçirlər **349**

Başqa Retro keçirilmiş RNT-lər Genom DNT-də Tapılmışdır **352**

Mobil DNT Elementləri Təkamülə Kifayət Qədər Təsir Etmişlər **352**

8.4 Genomiks: Genlərin Quruluşunun və Ekspressiyasının Geniş-Genom Analizi 355

Saxlanılan Ardıcıllıqlar Yeni İdentifikasiya Olunmuş Genlərin və Zülalların Funksiyalarını Təklif Edir **355**

Müxtəlif Növlərin Qohum Ardıcıllıqlarının Müqayisəsi Zülallar Arasında Təkamül Əlaqələrinə Dəlilləri Verə Bilər **356**

Genom DNT Ardıcıllığında Genlər İdentifikasiya Oluna Bilirlər **357**

Orqanizmin Genomunda Zülal Kodlaşdıran Genlərin Sayı Onun Bioloji Mürəkkəbliyi ilə Birbaşa Əlaqəli Deyil **358**

8.5 Eukariot Xromosomlarının Quruluşunun Təşkili 359

Xromatin Genişlənmiş və Sıxılmış Formalarda Olur **359**

Histon Quyruğunun Modifikasiyaları Xromatin Kondensasiyasına və Funksiyasına Nəzarət Edir **361**

Qeyri-histon Zülallar Uzun Xromatin İlgəklərini Təşkil Edirlər **366**

Əlavə Qeyri-histon Zülallar Transkripsiyanı və Replikasiyanı Tənzimləyir **371**

8.6 Eukariot Xromosomlarının Morfologiyası və Funksional Elementləri 373

Metafazada Xromosomların Sayı, Ölçüsü və Forması Növ-Spesifikdir **373**

Metafaza Zamanı Xromosomlar Bəndvermə Profilinə və Xromosom Rəngləməsinə Görə Fərqlənə Bilərlər **373**

Xromosom Rənglənməsi və DNT Ardıcıllığının Oxunması Xromosomların Təkamülünü Aşkar Edir **374**

İnterfaza Politon Xromosomlar DNT Amplifikasiyası Yolu İlə Yaranır **375**

Xromosomların Replikasiyası və Stabil İrsiyyəti üçün Üç Funksional Element Tələb Olunur **377**

Sentromer Ardıcıllıqalr Uzunluğuna və Mürəkkəbliyinə Görə Çox Fərqlidir **378**

Telomerazalarla Telomer Ardıcıllıqların Əlavə Olunması Xromosomların Qısalmasına Mane Olur **379**

9 Genlərin Ekspressiyasına Transkipsiya Səviyyəsində Nəzarət 384

9.1 Bakteriyalarda gen ekspressiyasına nəzarət 388

Transkripsiyanın Bakterial RNT Polimeraza ilə İnisiasiyası Siqma Faktorla Assosasiyanı Tələb Edir **388**

lac Operonun Transkripsiyası Repressiya Oluna və Fəallaşa Bilir **389**

Kiçik Molekullar Çox Sayda Bakteriya Genlərinin Ekspressiyasını DNT-Birləşdirən Aktivatorlarla və Repressorlarla Tənzimləyir **390**

Transkripsiyanın Bəzi Promotorlardan İnisiasiyası Alternativ Siqma Faktorlarını Tələb Edir **390**

σ^{54}-RNT Polimeraza ilə Transkripsiyaya Promotordan Çox Uzaqda Birləşmiş Aktivatorlarla Nəzarət Olunur **390**

Çox Bakterial Cavab Reaksiyaları İki-Komponentli Tənzimləyici Sistemlərlə Nəzarət Olunur **391**

Çox Bakterial Operonların Ekspressiyası Transkripsiyanın Elonqasiyasının Tənzimlənməsi ilə Nəzarət olunur **392**

9.2 Eukariotlarda gen nəzarətinə ümumi baxış 395

Eukariot DNT-lərin Tənzimləyici Elementləri Transkripsiyanın Start Saytına Yaxın və Çoxsaylı Kiloəsaslarla Kənarda Tapılmışdır **395**

Üç Eukariot RNT Polimeraza Müxtəlif RNT-lərin Formalaşmasını Kataliz Edir **396**

RNT Polimeraza II-nin Ən Böyük Subvahidi Vacib Karboksi-Terminal Təkrara Malikdir **401**

9.3 RNT Polimeraza II Promotorlar və Ümumi Transkripsiya Faktorları 402

RNT Polimeraza II mRNT-nin 5′ Papağına Uyğun Olan DNT Ardıcıllıqlarında Transkripsiyanı İnisiasiya Edir **402**

TATA Boks, İnisiatorlar və CpG Adalar Eukariot DNT-də Promotor kimi Fəaliyyət Göstərir **402**

Əsas Transkripsiya Faktorları RNT Polimerasa II-nı Start Sayta Yerləşdirir və İnisiasiyaya Kömək Edir **405**

Elonqasiya Faktorları Promotora-Yaxın Rayonda Transkripsiyanın İlkin Mərhələlərini Tənzimləyir **407**

9.4 Zülal Kodlaşdıran Genlərdə Tənzimləyici Ardıcıllıqlar və Onların Fəaliyyət Göstərdiyi Zülallar 408

Promotora-Yaxın Elementlər Eukariot Genlərini Tənzimləməyə Kömək Edir **408**

Uzaq Enhanserlər Çox Hallarda Traskripsiyanı RNT Polimeraza II ilə Stimullaşdırır **409**

Eukariot Genlərin Əksəriyyəti Çoxsaylı Transkripsiya-Nəzarət Elementləri ilə Tənzimlənir **410**

DNaza I Futprintinq və EMSA Zülal-DNT-Əlaqələrini Aşkar Edir **411**

Aktivatorlar Müxtəlif Funksional Domenlərdən Təşkil Olynmuşlar **413**

Repressorlar Aktivatorların Funksional Əksidir **415**

DNT-Birləşdirən Domenlər Çoxsaylı Quruluş Tiplərində Klassifikasiya Olunurlar **415**

Quruluşuna Görə Müxtəlif Aktivator və Repressor Domenlər Transkripsiyanı Tənzimləyir **417**

Transkripsiya Faktoru Qarşılıqlı Əlaqələri Gen-Nəzarəti Imkanlarını Artırır **419**

Çoxzülallı Komplekslər Enhanserləri Yaradırlar **420**

9.5 Transkripsiyanın Repressiyasının və Fəallaşmasının Molekulyar Mexanizmləri 421

Gen Ekspressiyasının Heteroxromatinlə Susdurulmasının Telomerlərdə, Sentromerlər Yaxınlığında və Başqa Rayonlarda Formalaşması **422**

Repressorlar Histon Deasetilləşməsini Spesifik Genlərdə İstiqamətləndirirə Bilirlər **424**

Aktivatorlar Histon Asetilləşməsini Xüsusi Genlərdə İstiqamətləndirə Bilir **425**

Xromatin-Remodelinq Faktorları Transkripsiyanın Fəallaşmasına və Repressiyasına Kömək Edir **426**

Pioner Trnskripsiya Faktorları Hüceyrə Differensasiyası Zamanı Gen Fəallaşması Prosesini İnisiasiya Edirlər **427**

Mediator Kompleks Fəallaşdırma Domenləri ilə Poli II Arasında Molekulyar Körpünü Yaradırlar **428**

9.6 Transkripsiya Faktorları Fəallığının Tənzimlənəsi 429

DN-aza I Hiperhəssas Saytlar Hüceyrə Differensasiyasının İnkişaf Tarixini Əks Etdirir **429**

Nüvə Reseptorları Hüceyrəxarici Siqnallar Vasitəsilə Tənzimlənir **430**

Bütün Nüvə Reseptorları Ümumi Domen Quruluşuna Malikdirlər **430**

Nüvə-Reseptoru Cavab Elementləri Çevrilmiş və ya Düzünə Təkrarlara Malikdirlər **432**

Hormonun Nüvə Reseptoruna Birləşməsi Onun Fəallığını Transkripsiya Faktoru kimi Tənzimləyir **432**

Metazoanlar Polimeraza II-nin İnisiasiyadan Elonqasiya Keçidini Tənzimləyir **434**

Transkripsiyanın Terminasiyası da Tənzimlənir **434**

9.7 Transkripsiyanın Epigenetik Tənzimlənməsi 436

DNT Metilləşməsi Transkripsiyanı Repressiya Edir **436**

Spesifik Histon Lizinlərinin Metilləşməsi Gen Repressiyasının Epigenerik Mexanizmləri ilə Əlaqəlidir **437**

Polikomb və Tritoraks Kompleksl Epigenetik Nəzarət **439**

Uzun Kodlaşdırmayan RNT-lər Metazoanlarda Birbaşa Epigenetik Repressiyadır **440**

9.8 Başqa Eukariotik Transkripsiya Sistemləri 444

Transkripsiyanın Pol I və Pol III ilə İnisiasiyası Pol II ilə İnisiasiyaya Analojidir **444**

10 Post-transkripsiya Gen Nəzarəti 449

10.1 Eukariot Pre-mRNT-nin prosessinqi 451

Transkripsiyanın İnisiasiyasından Az Sonra 5′ Papaq Yeni Sintez Olunan RNT-lərə Əlavə Olunur **452**

Konservativ RNT-Birləşdirən Domenə Malik Olan Müxtəlif Zülallar Dəsti Pre-mRNT-lərlə Birləşir **453**

Splaysinq İki Transefirləşmə Reaksiyaları ilə Pre-mRNT-lərin Qısa Konservativ Ardıcıllıqlarında Baş Verir **455**

Splaysinq zamanı snRNT-lər pre-mRNT ilə Əsas cütü Əmələ Gətirirlər **456**

snRNP-lərdən və Pre-mRNT-dən Toplanmış Splaysesomlar Splaysinqi Aparırlar **457**

RNT polimeraza II ilə Zəncirin Elonqasiyası RNT-Prosessinqi Faktorlarının Mövcud Olması ilə Bağlıdır **459**

SR zülallar Uzun Pre-mRNT-lərdə Eqzon Təyinolunmasına Kömək Edirlər **461**

Özünü-Splaysinq Qrup II İntronlar snRNT-lərin Təkamülini Sübutlarla Təmin Edir **461**

Pre-mRNT-lərin 3′ Kəsilməsi və Poliadenilləşməsi Sıx Şəkildə Bağlıdır **463**

Nüvə Eqzoribonukleazaları Pre-mRNT-lərdən Prosess Olunub Çıxmış RNT-ləri Parçalayır **464**

RNT Prosessinqi Metazoanların Genomunda Yayılmış Transkripsiyanın Problemini Həll Edir **466**

10.2 Pre-mRNT prosessinqinin tənzimlənməsi 467

Alternativ Splaysinq Eqzonların Fərqli Kombinasiyası ilə Transkriptləri Yaradır **467**

Tənzimlənən RNT Splaysinq Kaskadı *Drosophila*-da Cinsi Differensasiyaya Nəzarət Edir **467**

Splaysinq Repressorlar və Aktivatorlar Alternativ Saytlarda Splaysinqə Nəzarət Edirlər **469**

RNT Redaktəsi Bəzi Pre-mRNT-lərdə Ardıcıllığı Dəyişir **472**

10.3 mRNT-nin nüvə qabığından keçərək daşınması 473

SR Zülalların Fosforlaşması və Defosforlaşması mRNP-nin Nüvə Məsamələri Komleksindən Keçərək Eksportunun İstiqamətini Təmin Edir **474**

Həşarat Süfrəsinin Tüpürcək Vəzlərində Balbiani Halqa mRNP-lərin NPC-lərlə Eksportunun Birbaşa Vizuallaşmasına İmkan Verir **474**

Splaysosomlarda pre-mRNT-lər Nüvədən Eksport Olunmurlar **475**

HIV Rev Zülal Splays Olunmamış Virus mRNT-lərin Daşınmasını Tənzimləyir **476**

10.4 Post-transkripsiya nəzarətinin sitoplazmatik mexanizmləri 478

Sitoplazmada mRNT-lərin Parçalanması Bir Sıra Mexanizmlərlə Baş Verir **478**

mRNT-lərdə və lncRNT-lərdə Adeninlər N^6 Metilləşmə ilə Posttranskripsiya Modifikasiya Oluna Bilərlər **480**

Mikro RNT-lər spesifik mRNT-lərin Translyasiyasını Repressiya Edirlər **480**

Alternativ Poliadenilləşmə miRNT Nəzarət Variantlarını Artırır **482**

Müdaxilə RNT Dəqiq Komplementar Olan mRNT-lərin Parçalanmasını İnduksiya Edir **483**

Sitoplazmatik Poliadenilləşmə Bəzi mRNT-lərin Translyasiyasını Gücləndirir **484**

Zülalların Sintezi Qlobal Tənzimlənə Bilir **485**

Ardıcıllıq-Spesifik RNT-birləşdirən Zülallar Spesifik mRNT Translyasiyasına Nəzarət Edir **488**

Nəzarət mexanizmi Düzgün Prosess Olunmamış mRNT-lərin Translyasiyasına Mane Olur **489**

mRNT-lərin Lokalizasiyası Sitoplazmanın Xüsusi Rayonları Daxilində Zülalların İstehsalına İmkan Verir **490**

10.5 rRNT-nin və tRNT-nin prosessinqi 494

Pre-rRNT Genləri Nüvəcik Qurucuları Kimi Fəaliyyət Göstərirlər **495**

Kiçik Nüvə RNT-ləri Pre-rRNT-lərin Prosessinqinə Kömək Edir **495**

I Qrup İntronların Özünü-Splaysinqi Katalitik RNT-lərin İlk Nümunələri Olmuşdur **499**

Pre-tRNT-lər Nüvədə Geniş Modifikasiyaya Uğrayırlar **500**

Nüvə Cismləri Funksiyaca Xüsusiləşmiş Nüvə Domenləridir **502**

III Hissə Hüceyrənin Təşkili və Fəaliyyəti

11 İonların və Kiçik Molekulların Transmembran Daşınması 506

11.1 Transmembran Daşınmaya Ümumi Baxış 507

Yalnız Qazlar və Kiçik Yüksüz Molekullar Sadə Diffuziya ilə Membranı Keçirlər **507**

Membran Zülallarının Üç Əsas Sinifi Molekul və İonları Membrandan Keçərək Daşıyır **508**

11.2 Qlükoza və Suyun Asanlaşdırılmış Daşınması 510

Yuniport Daşınma Sadə Diffuziyaya Nisbətən Sürətli və Daha Çox Spesifikdir **510**

GLUT1 Yuniporterin Aşağı K_m-i Qlükozanın Əksər Məməli Hüceyrələrinin Daxilinə Daşımasını Mümkün Edir **511**

İnsan Genomu Şəkər-Daşıyan GLUT Zülallarını Kodlaşdırır **513**

Nəqliyyat Zülalları Süni Membranlardan və Rekombinant Hüceyrələrdən İstifadə Etməklə Öyrənilə bilər **513**

Osmotik Təzyiq Suyun Membrandan Keçərək Hərəkətinə Səbəb Olur **514**

Akvaporinlər Hüceyrə Membranının Su Keçiriciliyini Artırır **515**

11.3 ATP-ilə İşləyən Nasoslar və Hüceyrədaxili İon Mühiti **517**

ATP ilə-İşləyən Nasosların Dörd Əsas Sinifi Var **517**

ATP ilə-İşləyən İon Nasosları Hüceyrə Membranlarından Keçən İon Qradientlərini Yaradır və Saxlayırlar **518**

Əzələ Boşalmaları Ca^{2+}-u Sitozoldan Sarkoplazma Şəbəkəyə (Retikluma) Vuran Ca^{2+} ATPazalardan Asılıdır **519**

Ca^{2+} Nasosun Fəaliyyət Mexanizmi Ətraflı Məlumdur **519**

Kalmodulin Sitozolda Ca^{2+} Qatılığını Nizamlayan Plazma Membran Nasoslarını Tənzimləyir **522**

Na^+/K^+ ATPaza Heyvan Heceyrələrində Hüceyrədaxili Na^+ və K^+ Qatılıqlarını Saxlayır **522**

V-Sinif H^+ ATP-azalar Lizosomların və Vakuolların Fəallığını Saxlayır **523**

ABC Zülalları Geniş Müxtəliflikdə Dərmanları və Toksinləri Hüceyrədən Çıxarırlar **524**

Müəyyən ABC Zülallar Fosfolipidləri və Başqa Lipiddə-Həllolan Substratları Bir Membran Vərəqəsindən Digərinə "Atır" **527**

ABC Sistik Fibrozis Transmembran Tənzimləyici (CFTR) Nasos Deyil Xlorid Kanalıdır **528**

11.4 Qapanmayan İon Kanalları və Sakitləşən Membran Potensialı **528**

İonların Selektiv Hərəkəti Transmembran Elektrik Potensialını Yaradır **529**

Heyvan Heceyrələrində Sakit Membran Potensialı Əsasən K^+ İonlarının Açıq K^+ Kanalları ilə Xaricə Axmasından Asılıdır **530**

İon Kanalları Molekulyar "Selektivlik Filtiri" Yolu ilə Bəzi İonlar üçün Selektiv Olur **531**

Yamaq-Sıxaclar (Patch Clamps) İonların Bir Kanalla Hərəkətini Ölçməyə İmkan Verir **533**

Yeni İon Kanalları Ooosit Ekspresiyası və Sıxacın Kombinasiyası ilə Səciyyələndirilə Bilər **534**

11.5 Simporter və Antiporterlərlə Birgə-Nəqliyyat **535**

Na^+-un Məməlilərin Hüceyrəsinə Daxil Olması Termodinamik Cəhətdən Əlverişlidir **535**

Na^+-Əlaqəli Simporterlər Heyvan Hüceyrələrinə Qlükozanın və Amin Turşularının Yüksək Qatılıq Qradientinə Qarşı İmportunu Mümkün Edir **536**

Simporterin Necə İşlədiyini Bakterial Na^+/Amin turşusu Simporteri Aşkar Edir **537**

Na^+-Əlaqəli Ca^{2+} Antoporter Ürək Əzələ Dartılmasının Gücünü Tənzimləyir **537**

Bir-sıra Ko-daşıyıcılar Sitozol pH-nı Tənzimləyirlər **538**

Anion Antiporter CO_2-nin Qırmızı Qan Hüceyrələri ilə Daşınması üçün Əhəmiyyətlidir **539**

Çoxsaylı Nəqliyyat Zülalları Bitki Vakuollarının Metabolitləri və İonları Toplamasını Mümkün Edir **539**

11.6 Transhüceyrə Nəqliyyatı **541**

Qlükoza və Amin Turşularını Epitelidən Keçərək Daşımaq Üçün Çoxsaylı Nəqliyyat Zülalları Lazımdır **541**

Sadə Rehidrasiya Müalicəsi Qlükoza və Na^+ Udulmasından Yaranan Osmotik Qradientdən Asılıdır **542**

Parietal Hüceyrələr Sitozolun pH-ı Neytral Saxlamaqla Mədənin Tərkibini Turşulaşdırır **542**

Sümük Rezorpsiyası V-Sinif Proton Nasoslarının və Xlorid Kanalı Zülallarının Koordinasiya Olunmuş Fəaliyyətini Tələb Edir **543**

12 Hüceyrə Energetikası **546**

12.1 Qlükozadan Enerjini Toplamağın Birinci Mərhələsi: Qlikoliz **548**

Qlükoliz Zamanı (Mərhələ I) Sitozol Fermentləri Qlükozanı Piruvata Çevirirlər **549**

Qlikolizin Sürəti Hüceyrənin ATP-yə Olan Tələbatına Görə Tənzimlənir **549**

Oksigen Çatmadıqda Qlükoza Qıcğırır **551**

12.2 Mitoxondrinin quruluşu və fəaliyyəti **553**

Mitoxondrilər Çoxfunksiyalı Orqanoidlərdir **553**

Mitoxondrinin Quruluşuna və Funksiyasına Görə Fərqli İki Membaranı Var **554**

Mitoxondri Matrisada Yerləşmiş DNT-yə Malikdir **557**

mtDNT-nin Ölçüsü, Quruluşu və Kodlaşdırma Qabliyyəti Orqanizmlər Arasında Əhəmiyyətli Dərəcədə Dəyişir **558**

Mitoxondrial Genlərin Məhsulları Eksport Olunmur **560**

Mitoxondri *Rikettsia*-Bənzər Bakteriyanın Daxil Olduğu Vahid Endosimbiotik Hadisə ilə Yaranmışdır **560**

Mitoxondrial Genetik Kod Standart Nüvə Kodundan Fərqlənir **560**

Mitoxondrial DNTdə Mutasiya İnsanlarda Bir sıra Genetik Xəstəliklərə Səbəb Olur **561**

Mitoxondrilər Dinamik Orqanoidlər Olub Bir-Biri ilə Əlaqədə Olurlar **562**

Mitoxondrilərə Endoplazmatik Şəbəkə Tərəfindən Birbaşa Əlaqə ilə Təsir Edilir **564**

12.3 Limon Turşusu Tsikli və Yağ Turşusu Oksidləşməsi 566

II Mərhələnin Birinci Hissəsində Piruvat Asetil CoA və Yüksək-Enerjili Elektronlara Çevrilir **567**

II Mərhələnin Ikinci Hissəsində Limon Turşusu Tsikli Asetil CoA-da Asetil Qrupunu CO_2 Qədər Oksidləşdirir və Yüksək-Enerjili Elektronları Yaradır **568**

Daxili Mitoxondrial Membranda Daşıyıcılar Sitozol və Matrisada Müvafiq NAD^+ və NADH Qatılığının Saxlanılmasına Kömək Edirlər **568**

Yağ Turşularının Mitoxondrial Oksidləşməsi ATP Yaradır **570**

Yağ Turşularının Peroksisomlarda Oksidləşməsi ATP Yaratmır **572**

12.4 Elektron-Nəqliyyat Zənciri və Proton-Hərəkətverici Quvvənin Yaranması 573

NADH və $FADH_2$-nin Oksidləşməsi Əhəmiyyətli Miqdarda Enerji Buraxır **573**

Mitoxondridə Elektron Nəqliyyatı Proton Vurulması ilə Birləşir **573**

Elektronlar Elektron Daşıyıcıları Sırasından Keçərək "Aşağıya" Doğru Axır **574**

Dörd Böyük Multizülal Komplekslər Daxili Mitoxondrial Membranda Elektron Nəqliyyatını Protonların Vurulması Ilə Birləşdirir **576**

Elektron Nəqliyyat Zəmcirində Elektron Daşıyıcılarının Reduksiya Potensialı Elektronların NADH-dan O_2-ə Axmasını Gücləndirir **580**

Elektron Nəqliyyat Zəncirinin Multizülal Kompleksləri Superkomplekslərdə Toplanırlar **580**

Reaktiv Oksigen Nümunələri Elektron Daşınmasının Zəhərli Əlavə Məhsullarıdırlar **582**

Təmizlənmiş Elektron Nəqliyyat Zəncirindən İstifadə Edilən Eksperiment Proton Vurulmasının Stoixiometriyasını Yaratdı **584**

Mitoxondridə Proton-Hərəkətverici Qüvvə Əsasən Dxili Membrandan Keçən Gərginlik Qradientinə Bağlıdır **584**

12.5 Proton-Hərəkətverici Qüvvəsinin ATP sintezinə Qoşulması 585

ATP Sintezinin Mexanizmi Bakteriyalarda, Mitoxondrilərdə və Xloroplastlarda Oxşardır **585**

ATP Sintaza F_0 və F_1 Multuzülal Komplekslərdən Təşkil Olunmuşdur **586**

F_1 γ subvahidin Fırlanması, Protonların F_0-la Hərəkətinin İdarə Olunması ATP Sintezini Gücləndirir **587**

Bir ATP-ni Sintez Etmək üçün ATP Sintazadan Çoxsaylı Protonlar Keçməlidirlər **590**

F_0 c Halqanın Fırlanması Transmembran Kanallardan Axan Protonlarla Idarə Olunur **590**

Daxili Mitoxondrial Membranda ATP-ADP Mübadiləsi Proton-Hərəkətverici Qüvvə ilə Təmin Olunur **592**

Mitoxondrial Oksidləşmənin Sürəti Normal Halda ADP Səviyyəsindən Asılıdır **593**

Qəhvəyi Piydəki Mitoxondri İstilik Yaratmaq Üçün Proton-Hərəkətverici Qüvvəsindən İstifadə Edir **593**

12.6 Fotosintez və İşıq-Udan Piqmentlər 594

Xloroplastlarda Tilakoid Membranları Bitkilərdə Fotosintezedici Mərkəzlərdir **594**

Xloroplastlar Böyük DNTyə malikdirlər və Çox ZamanYüzdən Artıq Zülalı Kodlaşdırırlar **595**

Fotosintezin Dörd Mərhələsinin Üçü Yalnız İşıqlanma Zamanı Baş Verir **596**

Fotosistemlər Reaksiya Mərkəzi Təşkil Edirlər və Işıq-Toplayan Komplekslərindən İbarətdir **598**

Həyacanlaşmış Reaksiya-Mərkəzinin Xlorofil *a*-sından Fotoelektron Daşınması Yüklərin Ayrılmasını Yaradır **599**

Daxili Antenna və İşıq-Toplayıcı Komplekslər Fotosintezin Səmərəliliyini Artırır **600**

12.7 Fotosistemlərin Molekulyar Analizi 601

Purpur Bakteriyaların Tək Bir Fotosistemi Proton-hərəkətverici Qüvvəni Yaradır Amma O_2 Yox **601**

Xloroplastlar Fəaliyyətinə və Məkanına Görə İki Fərqli Fotosistemlərə Malikdirlər **603**

Bitki Fotosistemlərinin Hər İkisindən Keçən Xətti Elektron Axını, Proton-Hərəkətverici Qüvvəni, O_2 və NADPH Yaradır **604**

Oksigen-Yaradan Kompleks PSII Reaksiya Mərkəzinin Lumen Səthində Yerləşir **604**

Çoxsaylı Mexanizmlər Hüceyrəni Fotoelektron Daşınması Zamanı Reaktiv Oksigen Nümunələrinin Dağıtmasına Qarşı Mühafizə Edirlər **604**

PSI Vaitəsilə Tsiklik Elektron Axını Proton-Hərəkətverici Qüvvəsini Yaradır amma NADPH və ya O_2 Yaratmır **606**

Fotosistem I və II-nin Nisbi FəallıqlarıTənzimlənir **606**

12.8 Fotosintez Zamanı CO_2 Metabolizmi 608

Rubisco Xloroplast Stromasında CO_2-ni Fiksasiya Edir **608**

Fiksasiya Olunmuş CO_2-dən İstifadə Edərək Saxarozanın Sintezi Sitozolda Tamamlanır **610**

İşıq və Rubisco Aktivaza CO_2 Fiksasiyasını Stimullaşdırır **610**

Fototənəffüs Karbon Fiksasiyası ilə Rəqabətdədir və C_4 Bitkilərdə Azalmışdır **610**

II cild

13 Zülalların Membranlara və Orqanoidlərə Keçirilməsi 620

13.1 Zülalların ER Membranına və Membrandan Keçərək Hədəf Olunması 622

Təmizlənmiş ER Membranları ilə Puls-İzləmə Eksperimentləri İfraz Olunan Zülalların ER Membranını Kəsib Keçdiyini Nümayiş Etdirdi **622**
Hidrofob N-terminal Siqnal Ardıcıllığı Yeni Sintez Olunan İfrazat Zülallarını ER-ə Hədəf Edir **623**
Kotranslyasiya Translokasiyası İki GTP-Hidroliz Edən Zülalla İnisiasiya Olunur **625**
Uzunayan Polipeptidin Translokondan Keçməsi Translyasiya ilə Aparılır **626**
ATP Hidrolizi Mayada Bəzi İfrazat Zülallarının Post-translyasiya Translokasiyasını Gücləndirir **628**

13.2 Membran Zülallarının ER-ə Daxil Olması 630

İnteqral Membvran Zülallarının Birneçə Topoloji Sinifi ER membranda Sintez Olunur **630**
Daxili Stop-Ötürmə Lövbəri və Siqnal-Lövbər Ardıcıllığı Birdəfə-Keçən Zülallarda Topologiyanı Təyin Edir **630**
Çoxkəsibkeçən Zülallar Çoxsaylı Daxili Topogenik Ardıcıllığa Malikdirlər **633**
Fosfolipid Lövbər Bəzi Hüceyrə-Səthi Zülallarını Membrana Bağlayır **635**
Membran Zülallarının Topologiyası Çox Hallarda Onların Ardıcıllığından Təyin Edilə Bilər **635**

13.3 ER-də Zülalların Modifikasiyası, Bükülməsi və Keyfiyyətinə Nəzarət 637

Yaranmış *N*-Əlaqəli Oliqosaxaridlər Qırışlı ER-də Çox Zülallara Əlavə Olunurlar **637**
Oliqosaxarid Yan Zəncir Qlukozülalların Bükülməsini və Stabilliyini Gücləndirir **638**
Disulfid Əlaqələri Zülallar Vasitəsilə ER Lümenində Əmələ Gəlir və Yenidən Düzülür **639**
Zülalların Bükülməsini və Yığılmasını Çaperonlar və Başqa ER Zülallar Asanlaşdırırlar **641**
ER-də Səhv Bükülmüş Zülallar Zülal-Bükən Katalizatorların Ekspressiyasını İnduksiya Edir **642**
ER-də Toplanmamış və ya Dügün Bükülməmiş Zülallar Çox Zaman Parçalanmaq üçün Sitozola Daşınırlar **643**

13.4 Zülalların Mitoxondrilərə və Xloroplastlara Hədəf Olunması 644

Amfipatik N-Sonluq Hədəf Ardıcıllıqları Zülalları Mitoxondri Matrisasına Yönəldir **645**
Mitoxondrial Zülalın İmportu Xarici-Membran Reseptorlarını və Hər İki Membranda Translokonları Tələb Edir **646**
Ximer Zülallarla Aparılan Tədqiqatlar Mitoxondrial İmportun Əhəmiyyətli Xüsusiyyətlərini Nümayiş Etdirir **648**
Zülalların Mitoxondriyə İmportu üçün Üç Enerji Girişi Lazımdır **649**
Çoxsaylı Siqnallar və Yollar Zülalları Submitoxondri Kompartmentlərinə Hədəf Edirlər **649**
Xloroplast Stroma Zülallarının İmportu Mitoxondri Matrisa Zülallarının İmportuna Oxşardır **653**
Zülallar Bakteriyal Zülal Translokasiyasına Oxşar Olan Mexanizmlərlə Tilakoidə Hədəf Olunurlar **653**

13.5 Peroksisom Zülallarının Hədəf Olunması 655

Sitozol Reseptorları Zülalları C-Sonluqdakı SKL Ardıcıllıqla Peroksisomal Matrisaya Hədəf Edir **655**
Peroksisomal Membran və Matrisa Zülalları Müxtəlif Yollarla İnkorporasiya Olunurrlar **656**

13.6 Nüvə Daxilinə və Xaricinə Daşınma 658

Böyük və Kiçik Molekullar Nüvə Məsaməsi Komplekslərindən Keçərək Nüvəyə Daxil və Xaric Ola Bilir **658**
Nüvə Nəqliyyat Reseptoprları Nüvə-Lokalizasiya Siqnalına Malik Olan Zülalları Nüvə Daxilinə Aparır **659**
Nüvə Nəqliyyat Reseptorlarının Ikinci Tipi Nüvə Eksport Siqnalları Olan Zülalları Nüvədən Bayıra Aparır **662**
mRNT-lərin Əksəriyyəti Nüvədən Ran-dan-Asılı Olmayan Mexanizmlə Eksport Olunur **663**

14 Qovucuqlarla Daşınma, İfrazat və Endositoz 667

14.1 İfrazat Yolunu Öyrənmək Üçün Metodlar 669

İfrazat Yolu ilə Zülalların Daşınması Canlı Hüceyrələrdə Yoxlanıla Bilər **670**
Maya Mutantları Qovucuqlarla Daşınmanın Əsas Mərhələlərini və Çox Komponentlərini Təyin Edir **672**
Hüceyrəsiz Nəqliyyat Sınaqları Qovucuqlarla Daşınmada Fərdi Mərhələləri Ayırmağa İmkan Verir **673**

14.2 Qovucuqların Tumurcuqlaması və Qovuşmasının Molekulyar Mexanizmləri 674

Zülal Qabığın Toplanması Qovucuq Formalaşmasını və Yük Molekullarının Seçilməsini İdarə Edir **674**
GTP-aza Keçirici Zülalların Konservativ Dəsti Müxtəlif Qovucuq Qabıqlarının Toplanmasına Nəzarət Edir **676**
Yük Zülallarındakı Hədəfləmə Ardıcıllığı Qabıq Zülallarla Spesifik Kontakt Əmələ Gətirirlər **677**
Rab GTP-aza Qovucuqların Hədəf Membrana Birləşməsinə Nəzarət Edir **678**
SNARE Zülalların Cütləşmiş Dəsti Qovucuqların Hədəf Membranlarla Qovuşmasını Həyata Keçirir **678**
Membran Qovuşması ATP Hidrolizi ilə Aparıldıqdan Sonra SNARE Komplekslərin Dissosasiya Olunması **680**

14.3 İfrazat Yolunun İlkin Mərhələləri 680

COPII Qovucuqlar ER-dən Qolciyə Daşınmanı Həyata Keçirirlər **681**
COPI Qvucuqlar Qolci Daxilində və Qolcidən ER-ə Retroqrad Nəqliyyatı Həyata Keçirirlər **682**
Qolci Vasitəsi İlə Anteroqrad Daşınma Sisterna Yetişməsi ilə Baş verir **683**

14.4 İfrazat Yolunun Sonrakı Mərhələləri 685

Klatrin və Adaptor Zülallarla Örtülmüş Qovucuqlar trans-Qolcidən Nəqliyyatı Həyata Kleçirirlər **686**

Dinamin Klatrinlə-Örtülü Qovucuqların Qopub Ayrılması Üçün Tələb Olunur **687**

Mannoza 6-Fosfat Qalıqları Həllolan Zülalları Lizosomlara Hədəf Edir **687**

Lysosomal Saxlanma Xəstəliklərinin Öyrənilməsi Lysosomal Çeşidləmə Yolunun Əsas Komponentlərini Aşkar Etdi **690**

trans-Qolcidə Zülal Aqreqasiyası Zülalların Tənzimlənən İfrazat Qovucuqlarına Çeşidlənməsində Fəaliyyət Göstərə Bilər 690

Bəzi Zülallar *trans*-Qolcidən Çıxdıqdan Sonra Proteolitik Prosessinqə Məruz Qalırlar **691**

Bir Sıra Yollar Membran Zülallarını Polyarlaşmış Hüceyrələrin Apikal və ya Bazolateral Rayonunda Çeşidləyr **692**

14.5 Reseptorlar-Vasitəsi ilə Endositoz 694

Hüceyrələr Lipidləri Qandan Böyük və Yaxşı-Təyin Edilmiş Lipozülal Komplekslər Formasında Götürürlər **695**

Makromolekulyar Liqandların Reseptorları Onları Endositoza Hədəf Edən Çeşidləmə Siqnalına Malikdirlər **696**

Gecikən Endosomların Turş pH-ı Əksər Reseptor-Liqand Kompleksinin Dissosasiyasına Səbəb Olur **698**

Endositoz Yolu Endosomlarda Transferin-Transferin Reseptor Kompleksi Dissosasiya Etmədən Dəmiri Hüceyrələrə Çatdırır **699**

14.6 Membran Zülallarının və Sitozol Materiallarının Lizosomlara Yönəldilməsi 700

Çoxqovucuqlu Endosomlar Lizosomal Membranlar üçün Təyin Edilmiş Membran Zülallarını Lizosomal Parçalanma Üçün Təyin Edilmiş Zülallardan Ayırır **701**

Retroviruslar Çoxqovucuqlu Endosomların Formalaşmasına Oxşar Proseslə Plazma Membrandan Tumurcuqlayır **702**

Autofaq Yolu Sitozol Zülallarını və ya Tam Orqanoidi Lizosomlara Çatdırır **703**

15 Siqnal Ötürülməsi və G Zülallarla-Cütləşən Reseptorlar 708

15.1 Siqnal Ötürülməsi: Hüceyrəxarici Siqnaldan Hüceyrə Cavabına 710

Siqnal Molekulları Lokal və Məsafədən Təsir Göstərirlər **710**

Reseptorlar Yalnız Bit Tip Hormona və ya Çox Yaxın Olan Hormonlar Qrupuna Birləşir **711**

Proteinkinaza və Fosfatazalar Çox Siqnal Yollarında İstifadə Olunurlar **712**

GTP Birləşdirən Zülallar Həmişə Siqnal Ötürülməsində İşəsalan/Dayandıran Keçirici Kimi İstifadə Olunurlar **713**

Hüceyrədaxili "İkinci Mesencerlər" Çoxsaylı Reseptorlardan Siqnalları Ötürür **714**

Siqnal Ötürülməsi Yolu Hüceyrəxarici Siqmalların Təsirini Amplifikasiya Edir **714**

15.2 Hüceyrə-Səth Reseptorlarının və Siqnal Ötürən Zülalların Öyrənilməsi 716

Dissosasiya Sabiti (Konstantı) Reseptorun Öz Liqandına Affinlik Ölçüsüdür **716**

Birləşmə Sınaqları Reseptorları Aşakr Etmək Üçün və Onların Liqandlara Afinliyini və Spesifikliyini Təyin Etmək Üçün İstifadə Edilir **716**

Siqnal Molekullarına Maksimala-Yaxın Hüceyrə Cavabı Adətən Bütün Reseptorların Fəallaşmasını Tələb Etmir **717**

Xarici Siqnallara Qarşı Hüceyrənin Həssaslığı Səth Reseptorlarının Sayı və Onların Liqanda Afinliyi ilə Təyin Edilir **718**

Hormon Analoqları Dərman Kimi Geniş İstifadə Olunur **718**

Reseptorlar Afin Xromotoqrafiya Metodu Ilə Təmizlənə Bilər **719**

İmmunçökdürmə və Affinlik Metodları Siqnal Ötürən Zülalların Fəallığını Öyrənmək Üçün İstifadə Oluna Bilər **719**

15.3 G Zülallarla-Cütləşən Reseptorlar: Quruluşu və Mexanizmi 721

Bütün G Zülallarla-Cütləşən Reseptorlar Eyni Əsas Quruluşa Malikdirlər **722**

Liqandla-Fəallaşmış G Zülallarla-Cütləşən Reseptorlar Trimer G Zülalların α Subvahidində GTPnin GTPyə Dəyişməsini Kataliz Edirlər **725**

Müxtəlif G zülallar Müxtəlif GPCRlarla Fəallaşırlar və Sonra Müxtəlif Effektor Zülalları Tənzimləyirlər **727**

15.4 İon Kanallarını Tənzimləyən G Zülallarla-Cütləşən Reseptorlar 728

Asetilxolin Reseptorlar Ürək Əzələlərində K^+ Kanallarını Açan G Zülalı Fəallaşdırır **729**

İşıq Gözün Çöp (Rod) Hüceyrələrində G zülalla-cütləşən Rodopsini Fəallaşdırır **729**

Rodopsinin Işıqla Fəallaşması cGMP ilə Nizamlanan Kation Kanalının Bağlanmasına Səbəb Olur **730**

Siqnalın Amplifikasiyası Rodopsinlə Ötürülən Siqnal Yolunu Kəskin Şəkildə Həssaslaşdırır **732**

Rodopsin Siqnal Ötrülməsi Yolunun Tez Dayandırılması İti Görmə Üçün Əhəmiyyətlidir **732**

Çöp Hüceyrələr Ətraf İşığın Müxtəlif Səviyyələrinə Arrestin və Transdüsinin Heceyrədaxili Daşınması ilə Uyğunlaşırlar **733**

15.5 Adenilil Tsiklazanı Fəallaşdıran və ya İngibirləşdirən G Zülallarla-Cütləşən Reseptorlar 734

Adenilil Tsiklaza Müxtəlif Liqand-Reseptor Kompleksləri ilə Stimullaşır və İngibirləşir **736**

Quruluş Tədqiqatları $G_{\alpha s}$•GTPnin Adenilil Tsiklazaya Necə Birləşdiyini və Fəallaşdırdığını Müəyyən Etdi **736**

cAMP İngibitor Subvahidlərini Buraxmaqla Proteinkinaza A-nı Fəallaşdırır **737**

Qlikogen Metabolizmi Proteinkinaza A-nın Hormonla-Induksiya Olunan Fəallaşması ilə Tənzimlənir **738**

PKA-nın cAMP Vasitəsilə Tənzimlənməsi Müxtəlif Hüceyrə Tiplərində Geniş Cavab Reaksiyalarını Yaradır **738**

cAMP-Proteinkinaza A yolunda Siqnalın Amplifikasiyası Baş Verir **740**

CREB cAMP və PKA-nı Gen Transkripsiyasının Fəallaşması ilə Əlaqələndiri **740**

Lövbər Edən Zülallar cAMPnin Təsirini Hüceyrənin Spesifik Rayonlarına Lokalizasiya Edir **740**

Çoxsaylı Mexanizmlər GPCR/cAMP/PKA Yolundan Gələn Siqnalı Dayandırır **742**

15.6 Sitozolda və Mitoxondridə Ca^{2+} Səviyyəsini Qaldıran G Zülallarla-Cütləşən Reseptorlar 744

Mitoxondri Matrisasında, ER-də, və Sitozolda Kalsiumun Qatılığı Hədəf Olunan Fluoressen Zülalla Ölçülə Bilər **745**

Fəallaşmış Fosfolipaza C Membran Lipidi Fosfatidiinozitol 4,5-Difosfatdan Törənən İki İkinci Mesenceri Yaradır **745**

Ca^{2+}-Kalmodulin Kompleksi Xarici Siqnallara Çoxsaylı Hüceyrə Cavablarını Həyata Keçirir **749**

DAG Proteinkinaza C-ni Fəallaşdırır **750**

Ca^{2+} və cAMP İkinci Mesencerlərin Qarşılıqlı Əlaqəsi Qlikogenolizi Tənzimləyir **750**

Vazikulyar Saya Əzələlərdə Siqnalla-İnduksiya Olunan Boşalma Ca^{2+}-Azot Oksidi-cGMP-ilə Fəallaşan Proteinkinaza G Yolu ilə Vasitələnir **751**

16 Gen Ekspressiyasına Nəzarət Edən Siqnal Yolları 755

16.1 Smad-ları Fəallaşdıran Serin Kinaza Reseptoru 758

TGF-β Zülallar Hüceyrəxarici Matrisada Qeyri Fəal Formada Saxlanılır **759**

Üç Ayrı TGF-β Reseptor Zülalları TGF-β Birləşməsində və Siqnal Ötürülməsinin Fəallaşdırılmasında İştirak Edirlər **759**

Fəallaşmış TGF-β Reseptorlar Smad transkripsiya Faktorlarını Fosforlaşdırır **759**

Smad3/Smad4 Kompleks Müxtəlif Hüceyrə Tiplərində Müxtəlif Genlərin Ekspresiyasını Fəallaşdırır **761**

Mənfi Geriyəəlaqə İlgəyi TGF-β/Smad Siqnal Verilməsini Tənzimləyir **762**

16.2 Sitokin reseptorlar və JAK/STAT siqnal yolu 763

Sitokinlər Çox Hüceyrə Tiplərinin Inkişafına Təsir Edirlər **764**

Sitokini Öz Reseptouna Birləşməklə Bir və ya daha Artıq Sıx Birləşmiş JAK Zülal Tirozin Kinazanı Fəallaşdırır **765**

Fosfotirozin Qalıqları Konservativ Domenli Çoxsaylı Zülallar üçün Birləşmə Səthləridirlər **767**

SH2 Domenlərin Fəaliyyəti: JAK Kinazalar STAT Transkripsiya Faktorlarını Fəallaşdırır **768**

Çoxsaylı Mexanizmlər Sitokin Reseptorlardan Siqnalları Azalan- İstiqamətdə Tənzimləyir **769**

16.3 Reseptor TirozinKinazalar 770

Liqandın Birləşməsi RTK-nın Dimerləşməsini Gücləndirir və Onun Daxili Kinaza Xassəsinin Fəallaşmasına Səbəsb Olur **770**

Epidermal Boy Faktoru Reseptorunun Homo- və Hetero-oliqomerləri Epidermal Boy Faktoru Superailəsinin Nümayəndələrinə Birləşir **773**

EGF Reseptorun Fəallaşması Asimmetrik Fəal Kinaza Dimerinin Yaranmasına Səbəb Olur **774**

Çoxsaylı Mexanizmlər Sitokin Reseptorlardan Siqnalları Azalan-Tənzimləyir **774**

16.4 Ras/MAP Kinaza Yolu 775

Ras GTP-aza Keçirici Zülal Əksər RTK və Sitokin Reseptorların Ardınca Fəaliyyət Göstərir **776**

Drosophila-da Aparılan Genetik Tədqiqatlar Ras/MAP Kinaza Yolunda Əsas Siqnal Ötürən Zülalları Identifikasiya Etdi **776**

Tirazinkinaza Reseptorları Adapter Zülallar Vasitəsilə Ras-la Əlaqələnirlər **778**

Sos-un Qeyrifəal Ras-a Birləşməsi GTP-nin GDP ilə Əvəz olunmasına Səbə Olan Konformasiya Dəyişikliyini Əmələ Gətirir **779**

Siqnal Fəallaşmış Ras-dan Proteinkinazalar Kaskadına Keçir, MAP Kinaza ilə Sona Çatır **779**

MAP Kinazanın Fosforlaşması Onun Katalitik Fəallığını Artıran və Kinazanın Dimerləşməsini Gücləndirən Konformasiya Dəyişikliyinə Səbəb Olur **781**

MAP Kinaza Erkən Cavab Genlərini Nizamlayan Çoxsaylı Transkripsiya Faktorlarının Fəallığını Tənzimləyir **782**

G Zülallarla-Cütləşən Reseptoprlar Mayanın Cütləşmə Yolunda Siqnalları MAP Kinazaya Ötürürlər **783**

Eukariotik Hüceyrələrdə Skafold Zülllar Çoxsaylı MAP Kinaza Yollarını Ayırır **783**

16.5 Fosfoinozititd Siqnal Ötürülməsi Yolu 785

Fosfolipaza C_γ Bəzi RTK-lar və Sitokin Reseptorlarla Fəallaşır **786**

PI-3 Kinazanın Fəallaşmış Reseptora Səfərbər Olunması Üç Fosforlaşmış Fosfatidilinozitolun Sintezinə Səbəb Olur **786**

PI-3 Fosfatların Plazma Membranda Toplanması Bir Neçə Kinazanın Fəallaşmasına Səbəb Olur **787**

Fəallaşmış Proteinkinaza B Çoxsaylı Hüceyrə Cavablarını Induksiya Edir **787**

PI-3 kinaza Yolu PTEN Fosfataza ilə Mənfi Tənzimlənir **788**

16.6 Ubikvitinləşmə və zülal parçalanması ilə Nəzarət Olunan Siqnal Yolu: Wnt, Hedgehog və NF-$_K$B 788

Wnt Siqnalizasiya Transkripsiya Faktorunun Sitozol Zülal Kompleksindən Azad Olunmasına Səbəb Olur **789**

Wnt Zülalların Qatılıq Qradienti İnkişafın Çox Mərhələləri üçün Vacibdir **790**

Hedgehog Siqnalın Verilməsi Hədəf Genin Repressiyasını Buraxır **791**

Onurğalılarda Hedgehoq Siqnalı İlkin Kirpicikləri Tələb Edir **794**

İngibitor Zülalın Parçalanması NF-$_K$B Transkripsiya Faktorunu Fəallaşdırır **795**

Poliubikvitin Zənciri Reseptorları NF-$_K$B Yolunda Sonra Gələn Zülallarla Əlaqələndirən Skafold kimi Fəaliyyət Göstərr **797**

16.7 Zülal Doğranmaası ilə Nəzarət olunan Siqnal Yolu: Notch/Delta, SREBP və Alzheymar Xəstəliyi 798

Deltanın Birləşməsi ilə Notch Reseptor Doğranaraq Transkripsiya Faktoru Komponentini Azad Edir **798**

Matrisa Metalloproteazalar Çox Siqnal Zülallarının Hüceyrə Səthindən Kəsilməsini Kataliz Edir **800**

Amiloid Sələf Zülalın Münasib Olmayan Doğranması Alzeymer Xəstəliyinə Səbəb Olur **800**

SREBP-lərinTənzimlənən Membrandaxili Proteolizi Fosfolipid və Xolesterinin Səviyyəsinin Saxlanmasına Təsir edən Transkripsiya Faktorunu Buraxır **800**

16.8 Hüceyrə Cavablarının Müxtəlif Siqnal Yollarına İnteqrasiyası: İnsulinin təsiri 803

Qanda Şəkərin Miqdarını Stabil Saxlamaq Üçün İnsulin və Qlükaqon Birgə İşləyir **803**

Qanda Qlükozanın Artması İnsulininn β Adacıq Hüceyrələrdən İfrazını İşə Salır **804**

Piy və Əzələ Hüceyrələrində İnsulin GLUT4 Qlükozanın Daşıyıcısı Olan Hüceyrədaxili Qovucuqları Plazma Membranına Qovuşdurur **804**

İnsulin Qlükoza Sintezini İngibirləşdirir və Qlükozanin Qlikogen kimi Saxlanılmasını Gücləndirir **805**

Çoxsaylı Siqnal Ötrən Yollar Adiposit Differensasiyasını Tənzimləmək Üçün Əsas Transkripsiya Tənzimləyicisi PPARγ vasitəsi ilə Əlaqədə Olurlar **807**

İltihab Hormonları Şışmanlıqda Adipoz Hücre Funksiyasını Pozur **809**

17 Hüceyrənin Təşkili və Hərəkəti I: Mikrofilamentlər 812

17.1 Mikrofilaments və Aktin Quruluşlar 815

Aktin Qədimdir, Boldur və Yüksək Dərəcədə Konservativdir **815**

G-Aktin Monomerləri Uzun Spiral F-AktinPolimerlərində Yığılırlar **816**

F-Aktin Quruluşuna və Funksiyasına görə Polyarlığa Malikdir **817**

17.2 Aktin Filamntlərin Dinamikası 818

Aktin Polimerləşməsi In vitro Üç Mərhələdə Gedir **818**

Aktin Filamntlər (–) Sonluqlara Nisbətən (+) Sonunluqlarda Sürətlə Artır **819**

Aktin Filament Treadmilling-i Profilin və Cofilinlə Sürətlənir **821**

Timosin-β_4 Polimerləşmə üçün Aktin Ehtiyatını Təmin Edir **822**

Papaq Zülalları Atin Flamenti Uclarının Yığılmasını və Dağılmasını Blok Edir **822**

17.3 Aktin Filamenti Yığılmasının Mexanizmləri 823

Forminlər Şaxələnməmiş Filamentləri Toplayırlar **823**

Arp2/3 kompleks Şaxələnmiş Filament Aqreqatını Nukleasiya Edir **825**

Hüceyrədaxili Hərəkətlər Aktinin Polimerləşməsi İlə Gücləndirilir **826**

Mikrofilamentlər Endositozda Fəaliyyət Göstərirlər **828**

Aktin Monomerlri Toplusunu Həyacanlandıran Toksinlər Aktin Dinamikasını Öyrənmək Üçün Faldalıdır **829**

17.4 Aktin-Əsaslı Hüceyrə Quruluşlarının Təşkili 830

Kəsişən-Əlaqəli Zülallar Aktin Filamentlərini Bağlamlaqla və ya Şəbəkədə Düzülməsini Təşkil Edirlər **830**

Adaptor Zülallar Aktin Filamentləri Membranlara Bağlayır **831**

17.5 Miozinlər: Aktin-Əsaslı Motor Zülalları 833

Miozinlər Fərqli Funksiyaları Olan Baş, Boyun və Quyruq Domenlərinə Malikdirlər **834**

Miozinlər Mexanokimyəvi Motor Zülalların Böyük Ailəsini Təşkl Edir **836**

Miozun Başında Konformasiya Dəyişməsi ATP Hidrolizini Hərəkətlə Birləşdirir **837**

Miozin Baş Aktin Filamentlər Boyunca Disktret Addımlar Edir **839**

17.6 Miyozinlə-Gücləndirilən Hərəkət 840

Qalın Miozin Filamentlər və Nazik Aktin Filamntlər Skelet Əzələlərində Yığılma Zamanı Bir-Birinin YanındanSürüşərək Keçirlər **840**

Skelet Əzələsi Stabilləşdirici və Eşafolt Zülallarla Qurulmuşdur **842**

Skelet Əzələlərinin Yığılıb-Açılması Ca^{2+} və Aktin-Birləşdirən Zülallarla Tənzimlənir **842**

Aktin və Miozin II Yığılıb-Açılan Qeyri-əzələ Hüceyrələrində Bağları Əmələ Gətirir **844**

Miozindən-Asılı Mexanizmlər Saya Əzələ və Qeyri-əzələ Hüceyrələrində Yığılmanı Tənzimləyir **844**

Miozin V-Birləşmiş Qovucuqlar Aktin Filamentləri Boyunca Daşınır **845**

17.7 Hüceyrə Miqrasiyası: Mexanizmlər, Siqnal Verilməsi və Kemotaksis 848

Hüceyrənin Miqrasiyası Güc Əmələ Gəlməsini Hüceyrə Adgeziyası Və Membranın Yenidənistifadəsi ilə Koordinasiya Edir **848**

Kiçik GTP-Birləşdirən Zülal Cdc42, Rac, və Rho Aktinin Təşkil olunmasına Nəzarət Edir **850**

Hüceyrə Miqrasiyasına Cdc42, Rac və Rho Tənzimlənməsinin Əlaqələndirilməsi Daxildir **852**

Miqrasiya Edən Hüceyrələr Kemotaktik Molekullarla İdarə Olunurlar **853**

18 Hüceyrənin Təşkili və Hərəkəti II: Mikroborucuqlar və Aralıq Filamentlər 859

18.1 Mikroborucuqların Quruluşu və Təşkili 860

Mikroborucuq Divarları αβ-Tubulin Dimerlərdən İbarət Qütbləşmiş Quruluşdur **861**

Mikroborucuqlar Müxtəlif Konfiqurasiyaları Yaratmaq Üçün MTOC-dan Toplanırlar **862**

18.2 Mikroborucuqların Dinamikası 865

Fərdi Mikroborucuqlar Dinamik Qeyri Stabillik Numayiş Etdirirlər **865**

Yerli Toplanma və "Axtar və Tut" Microborucuqların Təşkilinə Kömək Edir **868**

Tubulin Polimerləşməsinə Təsir Edən Dərmanlar Eksperimentlərdə və Xəsrəliklərin Müalicəsində Faydalıdır **868**

18.3 Mikroborucuqların Quruluşu və Dinamikasının Tənzimlənməsi 869

Mikroborucuqlar Yandan-Birləşən Zülallarla Stabilləşirlər **870**

+TIP-lər Mikroborucuq (+) Sonluğun Fəaliyyətlərini və Xassələrini Tənzimləyir **871**

Digər Sonluğa-Birləşən Zülallar Mikroborucuq Dağlmasını Tənzimləyir **871**

18.4 Kinezinlər və Dineinlər: Mikroborucuq-Əsaslı Motor Zülallar 872

Aksonlarda Orqanoidlər Mikroborucuqlar Boyu Hər-iki İstiqamətdə Daşınırlar **872**

Kinezin-1 Qovucuqların Akson Boyu Mikroborucuqların (+) Sonluğuna Doğru Anteroqrad Nəqliyyatını Gücləndirir **874**

Kinezinlər Müxtəlif Funksiyaları Olan Böyük Zülal Superailəsini Təşkil Edirlər **874**

Kinezin-1 Yüksək Prosessiv Motordur **875**

Dinein Motorlar Orqanoidləri Mikroborucuqların (–) Sonluğuna Doğru Daşıyır **877**

Kinezinlər Və Dineinlər Hüceyrədə Orqanoidlərin Daşınmasında Kooperativdirlər **880**

Tubulinin Modifikasiyası Müxtəlif Sinif Mikroborucuqları və Onların Motorlarla Əlçatanlığını Fərqləndirir **881**

18.5 Kirpiciklər və Qamçılar: Mikroborucuq-Əsaslı Səth Quruluşlar 883

Eukariotik Kirpicik və Qamçılar Dynein Motors Tərəfindən Köprülənmiş Uzun Duplet Mikroborucuqlara Malikdirlər **883**

Kipiciklərin və Qamçıların Döyünməsi Xarici Duplet Mikroborucuqların Nəzarət Olunan Sürüşməsi ilə Əmələ Gəlir **883**

Qamçıdaxili Daşınma Matereialı Kirpiciklərdə və Qamçılarda Aşağıya və Yuxarıya Hərəkət Etdirir **885**

Əsas Kirpiciklər Interfaza Hüceyrələrində Sensor Orqanoidlərdir **886**

Əsas Kirpiciklərdəki Qüsurlar Çox Xəstəliklərə Səbəb Olur **888**

18.6 Mitoz 888

Sentrosomlar Hüceyrə Tsiklinin Əvvəliundə Mitoza Hazırlıq Zamanı İkiləşir **888**

Mitoz Altı Mərhələyə Bölünə Bilər **890**

Mitoz Şpindelı Üç Sinif Mikroborucuğa malikdir **891**

Mikroborucuqların Dinamikası Mitoz Zamanı Dramatic Şəkildə Artır **892**

Mitoz Asterləri Kinesin-5 Tərəfindən İtələnir və Dynein Tərəfindən yönləndirilir **893**

Prometafaza Zamanı Xromosomlar Tutulur və Yönəldilir **893**

İkiləşmiş Xromosomlar Motorlar və Mikroborucuq Dinamikası Vasitəsiulə Düzlənirlər **895**

Xromosom Sərnişin Kompleksi (Passenger Complex) Kinetoxorlarda Mikroborucuq Qoşulmasını Tənzimləyir **895**

Anafaza A Mikroborucuqların Qısalaması ilə Xromosomları Qütblərə Aparır **896**

Anafaza A Mikroborucuqların Qısalaması ilə Xromosomları Qütblərə Aparır **896**

Şpindelin Formalaşmasına Başqa Mexanizmlər də Kömək Edir **896**

Sitokinez İkiləşmiş Hüceyrəni İkiyə Ayırır **899**

Mitoz Zamanı Bitki Hüceyrələri Öz Mikroborucuqlarını Tanıyır və Hüceyrə Divarını Qururlar **899**

18.7 Aralıq Filamentlər 901

Aralıq Filamentlər Dinamikdirlər **901**

Sitoplazmatik Aralıq Filament Zülallar Toxuma-Spesifik Üsulda Ekspressiya Olunur **903**

Aralıq Filamentlər Subvahid Dimerlərdən Toplanırılar **903**

Laminlər Nüvənin Təşkilini və Sərtliyini Təmin Etmək üçün Daxili Nüvə Qabığını Nizamlayır **905**

Mitoz Zamanı Laminlər Fosforlaşmaqla Reversiv (Geriyədönəbilən) Dağılırlar **906**

18.8 Sitoskelet Elementlər Arasında Koordinasiya və Kooperasiya 907

Aralıq Filament-Assosasiyalı Zülalların Hüceyrənin Təşkilində Töhfəsi **907**

Mikrofilamentlər və Miroborucuqlar Melanosomların Daşınmasını Birgə Edirlər **907**

Hüceyrə Miqrasiyası Zamanı Cdc42 Mikroborucuqları və Mikrofilamentləri Əlaqələndirir **908**

Sinir Böyümə Konuslarının Inkişafı Mikrofilamentlər və Mikroborucuqlar Tərəfindən Koordinasiya Edilir **908**

19 Eukaryotik Hüceyrə Tsikli 912

19.1 Hücetyrə Tsiklinə Ümumi Baxış və Ona Nəzarət 914

Hüceyrə Tsikli Hüceyrəı İkiləşməsinə (Replikasiyasına) Aparan Hadisələrin Ardıcıl Sırasıdır **914**

Tsiklindən Asılı Olan Kinazalar Eukariot Hüceyrə Tsiklinə Nəzarət Edirlər **915**

Bir Neçə Əsas Prinsip Hüceyrə Tsiklini İdarə Edir **915**

19.2 Model Orqanizmlər və Hüceyrə Tsiklinin Öyrənilməsi Metodları 916

Tumurcuqlayan və Bölünən Mayalar Hüceyrə Tsiklinin Genetik Analizi Üçün Güclü Sistemlərdir **917**

Qurbağa Oositləri və Erkən Rüşüyimlər Hüceyrə Tsikli Maşınının Biokimyəvi Xarakterizə Edilməsinin Asanlaşdırır **918**

Meyvə Milçəyi İnkişafla Hüceyrə Tsikli Arasında Əlaqəni Aşkar Edir **919**

Toxuma Kulturası Hüceyrələrinin Öyrənilməsi Məməlilərdə Hücrye Tsiklinin Tənzimlənəsini Aşkar Edir **920**

Tədqiqatçılar Hüceyrə Tsiklini Öyrənmək üçün Çoxsaylı Vasitələrdən Istifadə Edirlər **921**

19.3 CDK Fəallığının Tənzimlənməsi 922

Tsiklindən-Asılı Olan Kinazalar Kiçik Proteinkinazalardır və Fəaliyyətləri üçün Tənzimləyici Tsiklin Subvahidini Tələb Edirlər **923**

Tsiklinlər CDK-lərin Fəaliyyətini Müəyyən Edirlər **923**

Tsiklinin səviyyəsi Əsasən Zülal Parçalanması ilə Tənzimlənir **925**

CDK-lər Fəallaşdırıcı və İngibirləşdirici Fosforlaşma ilə Tənzimlənirlər **926**

CDK Ingibitorlar Tsiklin-CDK Fəaliyyətinə Nəzarət Edirlər **926**

Gen Mühəndisliyi ilə Yaradılmış CDK-lər CDK Funksiyalarının Aşkar Olunmasına Səbəb Oldu **927**

19.4 Hüceyrə Tsiklinə Bağlılıq və DNT Replikasiyası 927

Hüceyrələr START və ya Restriksiya Nöqtəsi Adlanan Hüceyrə Tsikli Nöqtəsində Geridönməyən Şəkildə Bölünməy Gedirlər **928**

E2F Transkripsiya Faktoru və Onun Tənzimləyicisi Rb Metazoanlarda G1-S Faza Keçidini Nəzarət Edir **929**

Hüceyrıxarici Siqnallar Hüceyrə Tsiklinə Girişi İdarə Edir **929**

S faza CDK İngibitorun Parçalanması DNT Replkiasiyasını İşə Salır **930**

Hər Bir Mənşədən Replikasiya Bir dəfə və Hüceyrə Tsikli Dövründə Yalnız Bir dəfə İnisiasiya Olunur **932**

İkiləşmiş DNT Zəncirləri Replikasiya Zamanı Bağli Olurlar **934**

19.5 Mitoza Giriş 936

Mitoz CDK-lərin Sürətlə Fəallaşması Mtozu İnisiasiya Edir **936**

Mitoz CDK-ləri Nüvə Qabığının Dağılmasını Təşviq Edir **937**

Mitoz CDK-lər Mitoz Şpindel Formalaşmasını Təşviq Edir **938**

Xromosom Kondensasiyası Xromosom Seqreqasiyasını Asanlaşdırır **940**

19.6 Mitozun Tamamlanması: Xromosomların Seqreqasiyası və Mitozdan Çıxış 941

Kohezinlərin Separaza Vasitəsilə Kəsilməsi Xromosom Seqreqasiyasını İnisiasiya Edir **941**

APC/C Sekurin Ubikvitinilləşməsi ilə Separazanı Fəallaşdırır **942**

Mitoz CDK İnaktivasiyası Mitozdan Şıxmanı İşə Salır **942**

Sitokinezs İki Qız Hüvceyrəni Yaradır **944**

19.7 Hüceyrə Tsiklinin Tənzimlənməsində Nəzarət Müşahidə Mexanizmi 945

Yoxlama Nəzarət Yolları Aslılıqları Yaradır və Hücre Tsiklində Səhvlərin Qarşısını Alır **945**

Böyümənin Nəzarət Yoxlama Yolu Hüceyrələrin Hüceyrə Tsiklinə Daxil Olmasını Kifayət Qədər Makromolekul Biosentezdən Sonra Təmin Edir **945**

DNT Zədələnməsinə Cavab Sistemi DNT-nin Zədələndiyi Zaman Hüceyrə Tsiklnin Gedişini Dayandırır **946**

Şpindel Yığılmasının Nəzarət Yoxlama Yolları Xromosomlar Mitoz Şpindelinə Dəqiq Birləşənə Qədər Xromosom Seqreqasiyasına Mane Olur **949**

Spindle Mövqeyinin Yoxlama Nəzarət Yolu Nüvənin İki Qız Hüceyrə Arasında Düzgün Bölündüyünü Əmin Edir **950**

19.8 Hüceyrə Bölünməsinin Xüsusi Tipi: Meyoz 952

Hüceyrəxarici və Hüceyrədaxili Siqnallar Rüşeyim Hüceyrə Formalaşmasını Tənzimləyir **953**

Bir Neçə Əsas Xüsusiyyət Meyozu Mitozdan Fərqləndirir **954**

Rekombinasiya və Meyoz-Spesifik Kohezin Subvahidi Meyoz I-də Xüsusi Xromosom Seqreqasiyası üçün Lazımdir **956**

Bacı Xromatidlərin Ko-orientasiyası Meyoz I Xromosomların Seqreqasiyası üçün Kritik Əhəmiyyətlidir **958**

DNT Replikasiyası İki Meyoz Bölünmə Arasında İnisiasiya Olunur **958**

IV Hissə Hüceyrənin Böyüməsi və Differensasiyası

20 Hüceyrələrin Toxumalara inteqrasiyası 963

20.1 Hüceyrə-Hüceyrə və Hüceyrə-Hüceyrəxarici Matrisa Adgeziyası: Ümumi Baxış 965

Hüceyrə-Adgeziya Molekulları Bir-Biri ilə və Hüceyrədaxili Zülallarla Birləşir **965**

Hüceyrəxarici Matrisa Adgeziya, Siqnal Ötürülməs və Başqa Funksiyalarda İştirak Edir **967**

Çoxfunksiyalı Adeziya Molekullarının Təkamülü Müxtəlif Heyvan Toxumalarının Takamülünü Mümkün Etmişdir **971**

Hüceyrə-Adgeziya Molekulları Mexanotransduksiyanı Həyata Keçirirlər **971**

20.2 Hüceyrə-Hüceyrə və Hüceyrə-Hüceyrəxarici Matrisa Qovşaqları və Onların Adgeziya Molekulları 973

Epiteli Hüceyrələrinin Fərqli Apikal, Lateral və Bazal Səthləri Vardır **973**

Üç Tip Qovşaq Çox Hüceyrə-Hüceyrə və Hüceyrə-ECM Qarşılıqlı Əlaqələrini Həyata Keçirir **974**

Kadherinlər Adheren Qovşaqlarda və Desmosomlarda Hüceyrə-Hüceyrə Adgeziyasını Həyata Keçirirlər **975**

İnteqrinlər Epitelial-Hüceyrə Desmosomları da Daxil Olmaqla Hüceyrə-ECM Adgeziyanı Həyata Keçirirlər **979**

Sıx Qovşaqlar Orqanizmin Boşluqlarını Bağlayır və Membran Komponentlərinin Diffuziyasını Məhdudlaşdırır **981**

Connexinlərdən İbarət Olan Boş Qovşaqlar Kiçik Molekulların Bitişik Hüceyrələrin Sitozolu Arasında Birbaşa Keçməsinə İmkan Verir **984**

20.3 Hüceyrəxarici Matrisa I: Bazal Lamina 987

Bazal Lamina Hüceyrələrin Toxumada Toplanması üçün Əsası Təmin Edir **987**

Çox-Yapışqanlı Matrisa Zülalı Laminin Bazal Laminanın Komponentlərinin Əlaqələnməsinə Kömk Edir **990**

Təbəqə-Əmələgətirən IV Tip Kollagen Bazal Laminanın Əsas quruluş Komponentidir **990**

Proteoqlikan Perlekan Bazal Laminanın Komponentlərini və Hüceyrə-Səth Reseptorlarını Çarpaz-Əlaqələndirir **992**

20.4 Hüceyrəxarici Matrisa II: Birləşdirici Toxuma 993

Fibrilyar Kollagenlər Birləşdirici Toxumanın ECM-dəki Əsas Lifli Zülallarıdır **993**

Fibrilyar Kollagenlər Hüceyrə Xaricində Fibrillərə Ifraz Olunur və Toplanırlar **993**

I və II Tip Kollagenlər Müxtəlif Quruluşları Yaratmaq üçün Qeyrifibrilar Kollagenlərlə Assosasiya Edirlər **994**

Proteoqlikanlar və Onları Təşkil Edın GAG-lar ECM-də Müxtəlif Rol Oynayırlar **996**

Hialuronan Sıxılmaya Müqavimət Göstərir, Hüceyrə Miqrasiyasına Kömək Edir və Qığırdağa Gelə-Oxşar Xassə Verir **998**

Fibronektnlər Hüceyrələri və ECM-i Birləşdirir, Hüceyrənin Formasına, Differensasiyasına vəm Hərəkətinə Təsir Edir **998**

Elastik Fibrillər Çox Toxumalarda Təkrarlanan Uzanmaya və Yenidənspirallaşmaya İmkan Verir **1001**

Metalloproteazalar Hüceyrəxarici Matrisanı Yenidən Formalaşdırır və Parçalayırlar **1002**

20.5 Hərəkətli və Hərəkətsiz Hüceyrələrdə Yapışqan Əlaqələr 1003

İnteqrinlər Adgeziyaya Vasitəçilik Edir və Hüceyrələrlə Onların Üç-Ölçülü Əhatəsi Arasında Siqnalları Ötürür **1003**

İnteqrinlə-Vasitələnən Adgeziyanın Tənzimlənməsi və Hüceyrənin Hərəkətinə Nəzarət Edən Siqnal **1004**

ECM-lə Sitoskelet Arasındakı Əlaqə Əzələ Distrofiyasında Qüsurlu Olur **1006**

IgCAM-lar Sinir və Başqa Toxumalarda Hüceyrə-Hüceyrə Adgeziyasını Həyata Keçirirlər **1007**

Leykositlərin Toxuma Daxilinə Hərəkəti Yapışqan Qarşılıqlı Əlaqələrin Dəqiq Nizamlanmış Ardıcıllığı ilə Təyin Edilir **1008**

20.6 Bitki Toxumaları 1010

Bitki Hüceyrə Divarı Qlikozülallar Matrisasında Selliloza Liflərinin Laminatıdır **1010**

Hüceyrə Divarının İtirilməsi Bitki Hüceyrəsinin Böyüməsinə İmkan Verir **1011**

Plazmodesmata Bitişik Hüceyrələrin Sotozolunu Birbaşa Birləşdirir **1012**

Tunel Əmələgətirən Nanoborucuqlar Plazmodesmataya Oxşayır Molekulları və Orqanoidləri Heyvan Hüceyrələri Arasında Ötürür **1012**

Bitkilərdə Yalnız Çox Az Adgeziya Molekulları Aşkar Edilmişdir **1013**

21 Sütun Hüceyrələr, Hüceyrə Assimetriyası, Hüceyrə Ölümü 1017

21.1 Məməlilərin Inkişafının Erkən Dövrü 1019

Mayalanma Genomu birləşdirir **1019**

Məməlilərin Embrionunun Doğranması İlk Differensasiyaya Səbəıb Olur **1021**

21.2 Embrion Sütun Hüceyrələr və İnduksiya Olunmuş Pluripotent Sütun Hüceyrələr 1022

Daxili Hüceyrə Kütləsi ES Hüceyrələrin Mənbəyidir **1022**

Çoxsaylı Faktorlar ES Hüceyrələrin Pluripotentliyini Nizamlayır **1024**

Heyvanların Klonlaşdırılması Göstərir ki, Differensasiya Dönə Bilər **1025**

Somatik Hüceyrələr iPS Hüceyrələri Yarada Bilirlər **1025**

ES və iPS Hüceyrələr Differensiasiya Etmiş Funksional İnsan Hüceyrələrini Yarada Bilər **1028**

21.3 Çoxhüceyrəli orqanizmlərdə Sütun Hüceyrələr və Nişa 1030

Yetkin Planari Pluropotent Sütun Hüceyrəyə Malikdir **1030**

Multipotent Somatik Sütun Hüceyrələr Həm Sütün Hüceyrələrə Həm də Differensasiya Edən Hüceyrələrə Başlanğıc Verir **1030**

Müxtəlif Toxumaların Sütun Hüceyrələri Davamlı Şəkildə Nişaları Tuturlar **1032**

Rüşeyim-xətli Sütun Hüceyrələr Sperma və Yumurtanı Yaradır **1032**

Bağırsaq Sütun Hüceyrələri Fasiləsiz Şəkildə Bağırsaq Epitelisinin Bütün Hüceyrələrini Yaradırlar **1033**

Hematopoietik Sütun Hüceyrələr Qan Hüceyrələrini Yaradır **1037**

Nadir Hüceyrə Tipləri Hematopoietik Sütun Hüceyrələrin Nişasını Yaradırlar **1038**

Meristemlər Bitki Sütun Hüceyrələrin Nişasıdır **1040**

Mənfi Geriyə Əlaqə Gövdənin Apikal Sütun-Hüceyrə Populyasiyasını Saxlayır **1041**

Kökün mereistemi Quruluşuna və Funksiyasına Görə Gövdə Meristeminə Oxşayır **1042**

21.4 Hüceyrə Polyarlığının Mexanizmləri və Assimmetrik Hüceyrə Bölünməsi 1043

Daxili Polyarlıq Proqramı Cdc42-nin Daxil Olduğu Müsbət Geriyə Əlaqədən Asılıdır **1043**

Hüceyrə Bölünməsindən Öncə Hüceyrə Polyarlaşması Ümumi İerarxiya Mərhələləri ilə Davam Edir **1046**

Polyarlaşmış Membran Daşınması Cütləşmə Zamanı Mayanın Asimmetrik Böyüməsinə İmkan Verir **1046**

Nematod Embrionunda Par Zülallar Hüceyrə Asimmetriyasını Yönəldir **1047**

Par Zülallar və Digər Polyarlıq Kompleksləri Epiteli-Hüceyrə Polyarlığında Iştirak Edirlər **1049**

Planar Hüceyrə Polyarlığı Yolu Hüceyrələri Epiteli DaxilindəYönəldir **1051**

Par Zülallar Sütun Hüceyrələrin Asimmetrik Bölünməsində İştirak Edirlər **1053**

21.5 Hüceyrənin Ölümü və Onun Tənzimlənməsi 1054

Proqramlaşdırılmış Hüceyrə Ölümünün Çoxu Apoptoz Vasitəsilə Baş Verir **1055**

Təkamülcə Konservativ Zülallar Apoptoz Yolunda İştirak Edirlər **1057**

Kaspazalar İlkin Apoiptoz Siqnalını Amplifikasiya Edirlər və Əsas Hüceyrə Zülallarını Dağıdırlar **1059**

Neytrofinlər Neyronların Sağ Qalmasına İmkan Yaradır **1059**

Mitoxondri Onurğalıların Hüceyrələrində Apoptozun Tənzimlənməsində Mərkəzi Rol Oynayır **1061**

Bax və Bak Pro-apoptotik Zülallar Xarici Mitoxondri Membranında Məsamələri və Deşiyi Əmələ Gətirirlər **1061**

Mitoxondridən Sitoxrom *c* və SMAC/DIABLO Zülallarının Buraxılması Apoptosomun Yaranmasına və Kaspazanın Fəallaşmasına Səbəb Olur **1062**

Trofik Faktorlar Pro-apoptotik Yalnız-BH3 Zülal Bad-in Fəalsızlaşmasını İnduksiya Edir **1062**

Apoptoz Onurğalılarda Ətraf Mühit Stressi ilə Fəallaşan Yalnız-BH3 Pro-apoptotik Zülallarla Tənzimlənir **1064**

Hüceyrə Qətlinin İki Tipi Şiş Nekrozis Faktoru, Fas Liqandı və Əlaqəli Ölüm Siqnalları Tərəfindən İşə Düşür **1064**

22 Sinir Sistemi Hüceyrələri 1069

22.1 Neyronlar və Qlia: Sinir Sisyeminin Quruluş Blokları 1070

Məlumat Dentritlərdən Aksonlara Neyronlar Vasitəsilə Axır **1070**

Məlumat Aksonlar Boyu İon Axınının Təsir potensialı Adlanan Pulslar Kimi Hərəkət Edir **1071**

Məlumatlar Neyronlar Arasında Sinapsislərlə Axır **1072**

Sinir sistemi Çox Neyronlardan İbarət Olan Siqnal Sxemlərini İstifadə Edir **1072**

Qlial Hüceyrələr Myelin Təbəqələri Əmələ Gətirir və Neyronları Dəstəkləyir **1073**

Sinir Sütun Hüceyrələri Mərkəzi Sinir Sistemində Sinir və Qlial Hüceyrələri Yaradır **1076**

22.2 Gərginliklə-Açılan İon Kanalları və Təsir Potensialının Yayılması 1078

Təsir potensialının Böyüklüyü E_{Na}-a Yaxındır və Na^+-ın Açıq Na^+ Kanalları Vasitəsilə Daxilə Axmasıyla Baş Verir **1079**

Gərginliklə-Nizamlanan Na^+ və K^+ Kanallarının Ardıcıl Açılması və Bağlanması Təsir potensialını Yaradır **1079**

Təsir potensialı Azalmadan Biristiqamətli Yayılır **1083**

Sinir Hüceyrələri ATP Olmadan Çox Təsir potensialını Keçirirlər **1083**

Bütün Gərginliklə-Nizamlanan İon Kanalları Ümumi Quruluşa Malikdir **1083**

Gərginlik-Hissedən S4 α Spirallar Membran Depolyarlaşmasına Cavab Olaraq Hərəkət Edirlər **1084**

Kanal-Fəalsızlaşdıran Seqmentin Açıq Məsaməyə daxil Olması İon Axınını Bağlayır **1086**

Myelinləşmə İmpuls Keçiriciliyinin Sürətini Artırır **1087**

Fəaliyyıt Potensialı Myelinləşmiş Aksonlarda Düyündən Düyünə "Atılır" **1088**

İki Tip Qlia Myelin Təbəqələrini Əmələ Gətirir **1089**

İşıqla Fəallaşan İon Kanalları və Optogenetika **1090**

22.3 Sinapslarda əlaqələr 1092

Sinapsların Əmələ Gəlməsi Presinaptik və Postsinaptik Quruluşların Toplanmasını Tələb Edir **1093**

Neyrotransmitterlər H^+-əlaqəli Adaptor Zülallar Vasitəsilə Sinaptik Qovucuqlara Daşınırlar **1096**

Presinaptik Sonluqda Neyrotransmitterlə Yüklənmiş Sinaptik Qovucuqların Üç Ehtiyatı Mövcuddur **1097**

Ca^{2+} Daxilə Axması Neyrotransmitterlərin Buraxılmasına Səbəb Olur **1097**

Kalsium-Birləşdirən Zülal Sinaptik Qovucuqların Plazma Membranı ilə Qovuşmasını Tənzimləyir **1099**

Dinamini Olmayan Milçək Mutantları Sinaptik Qovucuqları Təkrar Istifadə Edəbilmirlər **1101**

Neyrotransmitterlərin Parçalanması və ya Geriyə Çəkilməsi ilə Sinapslarda Siqnal Ötürülməsi Dayandırılır **1101**

Asetilxolinlə-Nizamlanan Kation Kanallarinin Açılması Əzələ Dartılmasına Səbəb Olur **1101**

Nikotin Asetilxolin Reseptorun Bütün Beş Subvahidi İon Kanallarına Kömək Edir **1103**

Sinir Hüceyrələri Təsir potensialını Yaratmaq Üçün Hamıs-və ya Heçbiri Qərarı Üçün Çox Girişləri Inteqrasiya Edir **1103**

Boşluq Qovşağı Neyronlar Arasında və Qlia Arasında Birbaşa Əlaqəyə İmkan Verir **1104**

22.4 Ətraf Mühitin Hiss Olunması: Toxunmaq, Ağrı, Dad və Qoxu 1105

Mexanoreseptorlar Nizamlanan Kation Kanallarıdırlar **1105**

Ağrı Reseptorları da Tənzimlənən Kation Kanallarıdır **1106**

Dad Məməciklərinin Hüceyrələr Yarımqrupunda Beş Əsas Dad Duyulur **1108**

Çoxsaylı Reseptorlar Qoxunu Aşkar Edir **1110**

Hər Bir Qoxu Reseptor Neyronu Bir Tip Odorant Reseptorunu Ekspressiya Edir **1112**

22.5 Yaddaşın Formalaşması və Saxlanılması 1114

Yaddaş Neyronlar Arasında Sinapsların Sayının və Gücünün Dəyişilməsi ilə Formalaşır **1115**

Hipokampus Yaddaşın Formalaşması Üçün Tələb Olunur **1116**

Çoxsaylı Molekulyar Mexanizmlər Sinaptik Plastikliyə Kömək Edirlər **1117**

Uzun-Müddətli Yaddaşın Əmələ gəlməsi Gen Ekspressiyasını Tələb Edir **1119**

23 İmmunologiya 1122

23.1 Sahibin Müdafiəsinə Ümumi Baxış 1124

Patogenlər Orqanizmə Müxtəlif Yollarla Daxil Olur və Fərqli Saytlarda Replikasiya Edirlər **1124**

Leykositlər Bədən Boyu Dövrə Vurur və Toxumalarda Və Limfa Düyünlərində Məskunlaşırlar **1125**

Mexaniki və Kimyəvi Hüdudlar Patogenlərə Qarşı Müdafiənin Birinci Təbəqəsini Yaradır **1126**

Anadangəlmə Immunitet Ikinci Müdafiə Xəttini Yaradır **1127**

İltihab Yaralanmaya Qarşı Qazanılmış və Anadangəlmə İmmunitetin Əhatə Etdiyi Kompleks Cavabdır **1129**

Müdafiənin Üçüncü Xətti Qazanılmış İmmunitet Spesifiklik Nümayiş Etdirir **1131**

23.2 İmmunoqlobulinlər: Quruluşu və Funksiyası 1133

İmmunoqlobulinlərin Ağır və Yüngül Zəncirdən Təşkil Olunmuş Konserbativ Quruluşu Vardır **1133**

Müxtəlif İmmunoqlobulin İzotiplərin Hər Biri Fərqli Funksiyalarla Mövcud Olur **1133**

Hər Bir Naiv B Hüceyrə Unikal Immunoqlobulin Istehsal Edir **1135**

İmmunoqlobulin Domenlərin Disulfid Əlaqələrlə Stabilləşən Iki β Vərəqdən Təşkiul Olunmuş Xarakterik Bükülməsi Vardır **1136**

İmmunoqlobulinlərin Sabit Rayonu Onların Funksional Xassələrini Təyin Edir **1137**

23.3 Anticism Müxtəlifliyinin Yaradılması və B-Hüceyrələrin İnkişafı 1138

Funksional Yüngül Zəncir Geni V və J Gen Seqmentlərinin Toplanmasını Tələb Edir **1139**

Ağır-Zəncir Lokusun Yenidəntəşkilinə V, D və J Gen Seqmentləri Daxildirlər **1142**

Somatik Hipermutasiya Anticismlərin Yüksək Affinliklə Yaradılmasına Seçilməsinə Imkan Verir **1143**

B Hüceyrənin İnkişafı Sələf B-hüceyrə Reseptorundan Giriş Tələb Edir **1143**

Qazanılmış İmmun Cavabı Zamanı B Hüceyrələr Membarana-Birləşmiş Ig Hazırlayan Formadan İfraz Olunan Ig Hazırlayan Formaya Keçirlər **1145**

B Hüceyrələr Yaratdıqları İmmunoglobulinin İzotipini Dəyişə Bilərlər **1146**

23.4 MHC və Antigenin Təqdimatı 1147

MHC Eyni Növlərin Əlaqəsi Olmayan İki Fərdinin Transplantı Qəbul Etmə və ya Rədd Etmə Qabliyyətini Təyin Edir **1147**

Sitotoksik T hüceyrələrin Öldürücü Fəaliyyəti Antigen Spesifikdir və MHC ilə Məhduddur **1148**

Müxtəlif Funksional Xassəli T Hüceyrələr MHC Molekulların İki Fərqli Sinifi ilə İdarə Olunur 1**150**

MHC Molekullar Peptid Antigenlərə Birləşir və T-Hüceyrə Rreseptoru ilə Əlaqəyə Girir **1151**

Antigen Təqdimolunma Zülal Fraqmentlərinin MHC Məhsulları ilə Kompleks Əmələ Gətirdiyi və Hüceyrə Səthinə Yerləşdirdiyi Prosesdir **1152**

I Sinif MHC Yol Sitozol Antigenləri Təqdim Edir **1153**

I Sinif MHC Yolu Endositoz Yoluna Çatdırılan Antigenləri Təqdim Edir **1156**

23.5 T-Hüceyrələr, T-Hüceyrə Reseptorları və T-Hüceyrə İnkişafı 1158

T-Hüceyrə Reseptorunun Quruluşu İmmunoqlobulindəki F(ab) Zülalınkinə Bənzəyir **1159**

TCR Genlər İmmunoqlobulin Genləri ilə Eyni Qaydada Yenidən Təşkil Olunurlar **1160**

TCR-lərin Dəyişkən Qalıqlarının Çoxu V, D və J Gen Seqmentlərinin Qovşaqlarında Kodlaşdırılır **1161**

Antigen-Spesifik Reseptorlar Vasitəsilə Siqnal Verilməsi T və B Hüceyrələrin Proliferasiyasını və Differensasiyasını İşə Salır **1161**

MHC Molekullarını Tanıya Bilən T Hüceyrələr Müsbət və Mənfi Seçmə Prosesi ilə İnkişaf Edirlər **1163**

T hüceyrələr Timusda CD4 və ya CD8 Xəttinə Qoşulur **1164**

T Hüceyrələr Tam Fəallaşmaq Üçün İki Tip Siqnalı Tələb Edir **1165**

Sititoksik T hüceyrələr CD8 Ko-reseptoru Daşıyır və Öldürmək üçün İxtisaslaşmışlar **1166**

T Hüceyrələr Başqa İmmun-Sistemi Hüceyrələrinə Siqnalları Təmin Edən Sitokinlər Sırasını İstehsal Edirlər **1167**

Köməkçi T Hüceyrələr Onların Sitokin İstehsalına və Səth Markerlərin İstehsalına Görə Fərqli Yarımbölmələrə Ayrılırlar **1167**

Leykositlər Kemokinlər Tərəfindən Təmin Olunan KimyəviMaddələrə Cavab Olaraq Hərəkət Edirlər **1167**

23.6 Qazanılmış İmmun Cavabında İmmun Sistemi Hüceyrələrinin Əməkdaşlığı 1168

Toll-Bənzər Reseptorlar Müxtəlif Patogen Mənşəli Makromolekulyar Nümunələri Qəbul Edirlər **1169**

Toll-Bənzər Reseptorlar Antigen-Təqdim Edən Hüceyrələrin Fəallaşmasına Səbəb Olur **1170**

Yüksək-Affinlikli Anticismlərin İstehsalı B və T Hhüceyrələr Arasında Əməkdaşlaığı Tələb Edir **1171**

Peyvəndlər Müxtəlif Patogenlərə Qarşı Qoruyucu İmmuniteti Yaradır **1173**

İmmun sistemi xərçəngə qarşı mühafizə edir **1174**

24 Xərçəng 1177

24.1 Şiş Hüceyrələri Normal Hüceyrələrdən Necə Fərqlənir 1178

Əksər Xərçəng Hüceyrələrinin Genetik Tərkibi Dramatik Şəkildə Dəyişilir **1179**

Hüceyrənin Evdarlıq Funksiyalararı Xərçəngdə Fundamental Şəkildə Dəyişir **1179**

Nəzarət Olunmayan Proliferasiya Xərçəngin Universal Əlamətidir **1181**

Xərçəng Hüceyrələri Toxuma Məhdudluğundan Xilas Olurlar **1182**

Şişlər Onların Ətraf Mühitləri Tərəfindən Yaradılmış Heterogen Orqanlardırlar **1182**

Şişin Böyüməsi Yeni Qan Damarlarının Yaranmasını Tələb Edir **1183**

Zəbt eləmə və Metastaz Şiş Əmələgəlmənin (Tumorogenezin) Sonrakı Mərhələsidir **1183**

24.2 Xərçəngin İnkişafının Mənşəi 1185

Karsinogenez DNT-ni Zədələməklə Xərçəngi İnduksiya Edir **1185**

Bəzi Karsinogenlər Spesifik Xərçənglə Əlaqəlidirlər **1186**

Multi-Hit Model Xərçəngin İnkişafını İzah Edə Bilir **1187**

Ardıcıl Onkogen Mutasiyalar Yoğun Bağırsaq Xərçənglərində İzlənilə Bilər **1188**

Xərçəngin İnkişafı Kultura Olunmuş Hüceyrələrdə və Heyvan Modellərində Öyrənilə Bilər **1190**

24.3 Xərçəngin Genetik Əsasları 1192

Funksiyanın-Qazanılması Mutasiyaları Proto-Onkogenləri Onkogenlərə Çevirir **1192**

Xərçəng-Əmələgətirən Viruslar Onkogenlərə Malikdirlər və ya Hüceyrənin Proto-onkogenlərini Fəallaşdırırlar **1194**

Şiş-Supressor Genlərində Funksiyanın-İtirilməsi Mutasiyaları Onkogen Mutasiyalardır **1195**

Şiş-Supressor Genlərində Irsən Keçmiş Mutasiyalar Xərçəng Riskini Artırır **1195**

Epigenetik dəyişilmələr Tyumorogenezə kömək Edə Bilir **1197**

Mikro RNTlər Tumorogenezi İngibirləşdirə və Təşviq Edə Bilir **1198**

Tədqiqatçılar Tumorogenezin Aparıcılarını İdentifikasiya Edirlər **1199**

Molekulyar Hüceyrə Biologiyası Xərçəngin Necə Diaqnoz Olunmasını və Müalicəsini Dəyişir **1200**

24.4 Xərçəngdə Hüceyrə Artmasının və Ölümünün Düzgün Tənzimlənməməsi 1201

Onkogen Reseptorlar Xarici Boy Faktorları Olmadan Proliferasiyanı Təşviq Edə Bilir **1202**

Çox Onkogenlər Konstitutiv Fəal Siqnal-Ötürən Zülalları Kodlaşdırır **1202**

Nüvə Transkripsiyası Faktorlarının Uyğunolmayan İstehsalı Transformasiyaya Səbəb Olur **1203**

İnkişafa Nəzarət Edən Siqnal Yollarındakı Aberrasiyalar Çox Xərçənglərlə Bağlıdır **1204**

Apoptozu Tənzimləyən Genlər Proto-onkogenlər və ya Şiş-Supressor Genləri Kimi Fəaliyyət Göstərirlər **1206**

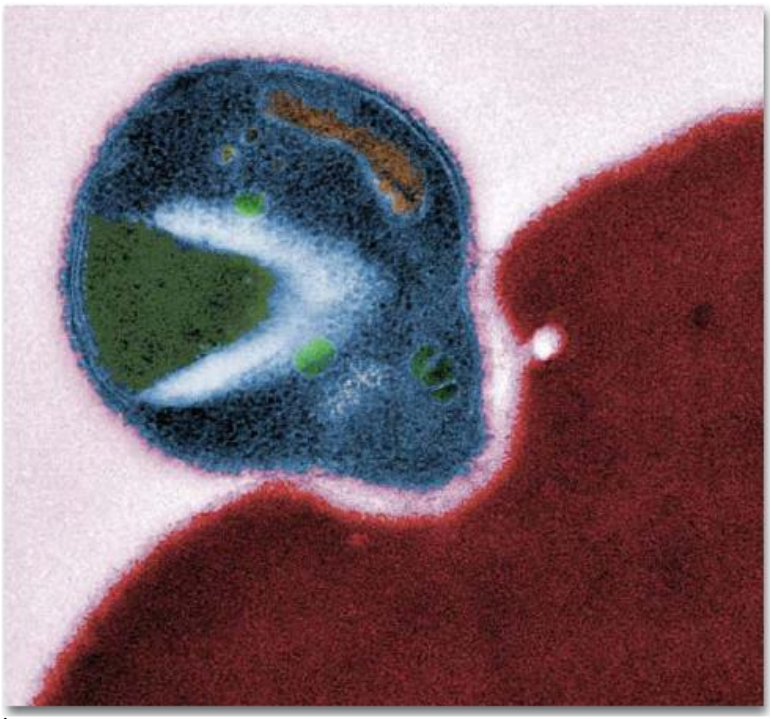
24.5 Xərçəngdə Hüceyrə Tsikli və Genomun Qorunub Saxlanılması Yollarının Tənzimlənməsi 1206

G1-dən S Fazaya Tənzimlənməyən Keçidi Təşviq Edən Mutasiyalar Onkogendirlər **1207**

p53-ün İtirilməsisi DNT Zədələnməsinin Yoxlama-Məntəqəsini Ləğv Edir **1208**

DNT-Reparasiya Sisteminin İtirilməsi Xərçəngə Səbəb Ola bilir **1210**

GLOSSARY – LÜĞƏT 1215



İki hüceyrə ölüm-dirim çarpışmasında: malariya paraziti insanın qırmızı qan hüceyrəsinə hücum edir. [Nəzakətlə Dr Stuart Ralfdan, Melburun Universiteti.]

FƏSIL

1

Molekullar, Hüceyrələr və Model Orqanizmlər

Biologiyada heç bir şey təkamül qədər düşündürmür.
(*Nothing in biology makes sense except in the light of evolution*)
– Theodosius Dohzhansky
Amerika Biologiyasının oçerki
Theacher 35: 125-129, 1973

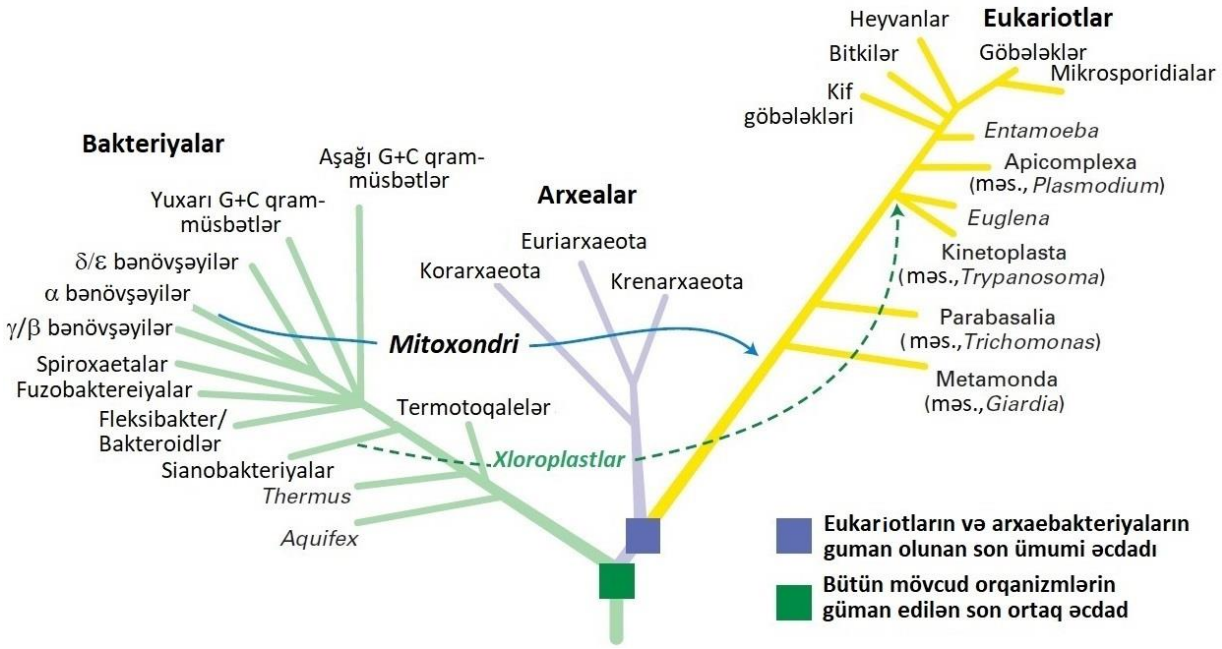
Biologiya materiyanın, riyazi formulalarla təsvir olunabilən dəyişməyən xassələrini öyrənən fizika və ya kimyadan əsaslı şəkildə fərqlənən elm sahəsidir. Təbii ki, bioloji sistemlər kimyanın və fizikanın qanunlarına əməl edir, amma biologiya tarixi elmdir, necə ki, bu gün canlı aləmin forması və quruluşu milliardlarla illər davam edən *təkamülün* nəticəsidir. Müasir eranın çox böyük müxtəlifliyinə malik olan bitkilər, heyvanlar, mikroorqanizmlər kimi bütün orqanizmlər təkamül yolu ilə çox qədim dövrlərdə yaşamış ibtidai birhüceyrəli orqanizmlərdən törəyərək ailə ağacında bir-birinə qohumdurlar (Şəkil 1-1; Cədvəl 1-1). Çarliz Darvinin mütəfəkkir fikirləri (Şəkil 1-2) təbii seçmənin prinsipləri olmuşdur: oraqnizmlər təsadüfi dəyişilirlər və ətraf mühitin ehtiyatlarına görə öz aralarında rəqabətdədirlər. Yalnız sağ qalaraq çoxala bilənlər öz genetik əlamətlərini ötürə bilirlər.

İlk baxışdan bioloji aləm çox kiçik mamırlardan çox hündür küknar ağaclarına qədər, yalnız mikroskop altında görünə bilən tək-hüceyrəli bakteriyalardan və protozoalardan bütün tip çoxhüceyrəli heyvanlar aləminə qədər son dərəcə qəribə müxtəlifliyə malikdir. Həqiqətəndə hüceyrələr ölçüsünə və formasına görə heyrətləndirici dərəcədə müxtəlifliyə malikdirlər (Şəkil 1-3). Bəziləri sürətlə hərəkət edir və sürətlə-dəyişən quruluşa malikdirlər, biz onu ameobaların və rotatorilərin hərəkətində görə bilirik. Bəziləri daha çox stasionardır və quruluş stabilliyinə malikdirlər. Oksigen bəzi hüceyrələri öldürür, amma əksəriyyətinin ona tam tələbatı var. Baxmayaraq ki, bəzi birhüceyrəli orqanizmlər tək yaşayırlar (Şəkil 1-3a), başqaları koloniyaları əmələ gətirirlər və ya digər tip orqanizmlərlə sıx assosasiyada yaşayırlar (Şəkil 1-3b, d), məsələn, bitkiyə havadan azotu ayırıb istifadə etməyə kömək edən bakteriyalar və ya bağırsaqda qidanın həzminə kömək edən bakteriyalar.

Buna baxmayaraq, bioloji formaların təəccübləndirici dərəcədə müxtəlifliyi onların çox güclü eyniliyi ilə örtülür: bizim ümumi əcdadımızın hesabına bütün bioloji sistemlər, eyni tip kimyəvi molekullardan təşkil olunublar və hüceyrə səviyyəsində təşkil olunmağın eyni prinsiplərindən və mexanizmdən istifadə edirlər. Baxmayaraq ki, bioloji molekulların əsas tipləri milyard illər boyunca təkamülün gedişində qorunub saxlanmnışdır, amma onların yığılaraq funksional hüceyrəni və orqanizmləri yaratmaq yolları əhəmiyyətli dərəcədə dəyişikliklərə uğramışdır.

QISA ICMAL

1.1 Həyat molekulları
1.2 Prokariot Hüceyrələr Quruluşu və Funksiyası
1.3 Eukariot Hüceyrələr, Quruluşu və Funksiyası
1.4 Birhüceyrəli Eukariotik Model Orqanizmlər
1.5 Metazoanların Quruluşu, Differensasiyası və Model Orqanizmlər



ŞƏKİL 1-1 Bütün canlı orqanizmlər ümumi əcdad hüceyrədən törəmişlər. Bütün orqanizmlər, sadə bakteriyalardan tutmuş mürəkkəb məməlilərə qədər yəqin ki, ümumi birhüceyrəli əcdaddan yaranmışlar. Bu ailə ağacı orqanizimlərin üç əsas xətti arasında təkamülcə yaxınlığı təsvir edir. Ağacın quruluşu ilkin olaraq morfoloji kriteriya üzrə müəyyən olunmuşdur: bu kriteriyaya görə bir-birinə daha çox oxşayanlar bir-birinə çox yaxın yerləşdirilmişlər. Son zamanlar orqanizmlərdə tapılmış DNT və zülalların ardıcıllığının oxunması qohumluq əlaqələrinin yaradılmasında daha informativ və zəngin kriteriya olmuşdur. Bu makromolekulların ardıcıllığındakı oxşarlıq nə qədər yaxın olarsa güman olunur ki, orqanizmlər də o qədər yaxın qohumdurlar. Morfoloji müqayisəyə əsaslanan və qazıntılaradan alınan müqayisəyə əsaslanan ağac molekulyar analizdən alınan verilənlərlə qurulmuş qohumluq ağacına son dərəcə yaxındır. [Verilənlər J.R. Brown 2005 "Universal tree of life" In Encyclopedia of Life Scienmces, *Whiley InterScience* (online).]

CƏDVƏL 1-1 Yer üzərində həyatın təkamülinin Qazıntı qeydlərinə görə təyin edilmiş qrafiki

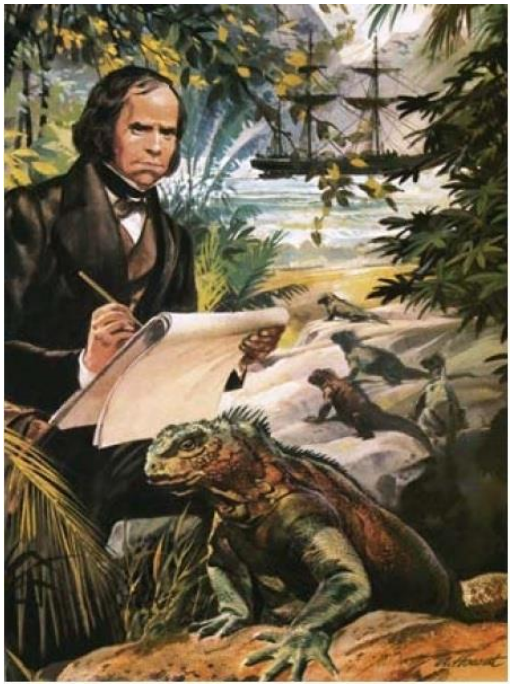
4600 million il əvvəl	Gənc günəş ətrafında fırlanan materialdan Yer kürəsi formalaşır
~3900-2500 million illər əvvəl	Prokariotlara oxşayan hüceyrələr yaranır. Bu ilk orqanizmlər hemoavtotroflardır: onlar, karbon mənbəyi kimi karbon iki oksidi istifadə edirlər və qeyri üzvi materialı oksidləşdirərək enerji əldə edirlər
3500 million il əvvəl	Sonuncu universal əcdadın həyat müddəti; bakterialarla arxealar arasında bölünmə başlanır.
2700 million il əvvəl	Fotosintezedici *cyanobacteria* yaranır; onlar suyu reduksiya edici agent kimi istifadə edirlər və tullanti kimi oksigeni yaradırlar
1850 million il əvvəl	Birhüceyrəli eukariotlar yaranır.
1200 million il əvvəl	Əsasən məhdud mürəkkəbliyə malik olan hüceyrə koloniyalarından ibarət, sadə çox-hüceyrəli orqanizmlər yaranır.
580-500 million il əvvəl	Kembri patlayışının qazıntı rekordlarına əsasən, heyvanların müasir taksonları yaranmağa başlayır.
535 million il əvvəl	Okeanlarda canlı aləmin xordalılara, artropodlara (məsələn, trilobitlər, xərçəngkimilər), exinodermlərə, molyusklara, braxiopodlara, foraminiferlərə, radiolarianlara və sair əsas ayrılması baş verir.
485 million il əvvəl	Əsil sümüyə malik olan ilk onurğalılar (çənəsiz balıqlar) yaranır.
434 million il əvvəl	Torpaqda ilk pirimitiv bitkilər yaranır.
225 million il əvvəl	İlk dinozavrlar (prosauropodlar) və sümüklü balıqlar yaranır.
220 million il əvvəl	Çılpaqtoxumlu meşələr quruda dominantlıq edir; otyeyənlər çox iri ölçüdə böyüyürlər.
215 million il əvvəl	İlk məməlilər yaranırlar.
65.6 million il əvvəl	Üçüncü-Tabaşir dövrünün sönmə hadisəsi təxminən heyvanlar aləminin yarısının, o cümlədən dinozavrların hamısının yox olmasına səbəb olur
6.5 million il əvvəl	Ilk hominoidlər yaranır.
2 million il əvvəl	Homo cinsinin ilk nümayəndələri yaranır.
350 min il əvvəl	Neandartallar yaranır.
200 min il əvvəl	Anatomik cəhətdən ilk insanlar Afrikada yaranır.
30 min il əvvəl	Neondartalların nəslinin kəsilməsi.

Biz indi bilirik ki, kimyəvi cəhətdən **dezoksiribonuklein turşularından** (DNT) ibarət olan **genlər** nəticədə bioloji quruluşu və onun hüceyrə funksiyasına inteqrasiyasını müəyyən edir. Çoxsaylı genlər **zülalları,** hüceyrə quruluşunu təşkil edən və hüceyrə fəallığını həyata keçirən ilkin molekulları kodlaşdırır. Genlərin quruluşunda və təşkilindəki dəyişikliklər, və ya **mutasiyalar** bioloji quruluşu və funksiyanı dəyişdirə bilən təsadüfi variasiyaları təmin edir. Təsadüfi mutasiyaların böyük əksəriyyəti genlərin və ya zülalların funksiyasına müşahidə oluna bilməyən təsir etdiyindən çoxu ziyanlı olurlar, yalnız az bir hissəsi takamülün üstünlüyünü təmin edir. Bütün orqanizmlərdə, DNT-də mutasiyalar konstant şəkildə meydana çıxır və zamanın gedişi müddətində hüceyrələrin quruluşunda və funksiyalarında onlara üstünlük verə bilən kiçik dəyişikliklərə səbəb olur. Tamamilə yeni quruluşlar nadir hallarda yaranır; daha çox hallarda mövcud olan hüceyrə quruluşu orqanizmi yeni şəraitə daha yaxşı uyğunlaşdıran dəyişikliklərə uğrayır. Zülaldakı kiçik dəyişikliklər onun funksiyasında əhəmiyyətli dəyişikliklərin yaranmasına səbəb ola bilər və ya onun funksiyasını tamamilə itirə bilər.

Məsələn, xüsusi bir orqanizmdəki bir gen təsadüfi şəkildə ikiləşə bilir (duplikasiya olunur), bu genlərdən bir nüsxə və onun kodlaşdırdığı zülal öz orjinal funksiyasını saxladığı halda, ikinci nüsxə müəyyən bir zaman ərzində elə mutasiya olunur ki, onun kodlaşdırdığı zülal bir az fərqli funksiyaya və ya tamamilə yeni funksiyaya malik olur. Bəzi orqanizmlərin təkamülü gedişində onun bütöv genomu ikiləşir və onun genlərinin çoxunun ikinci nüsxəsinin mutasiyalara uğramasına və yeni funksiya qazanmasına imkan verir. Bu prosesdə orqanizmlərin hüceyrə səviyyəsində təşkili fundamental rol oynayır, çünki o bu dəyişikliklərin baş verməsinə əvvəllər inkişaf etmiş hüceyrədə kiçik dəyişikliklərin yaranması və beləliklə onlara yeni qabiliyyətin verilməsi ilə imkan verir. Nəticədə yaxın qohum olan orqanizmlər çox oxşar genlərə, zülallara və hüceyrə təşkilinə malik olurlar.

İnsanın bədəni də daxil olmaqla canlı sistemlər çox yaxın qarşılıqlı əlaqədə olan elementlərdən elə təşkil olunublar ki, istənilən bir element başqalarından ayrıldıqda tam qiymətləndirilə bilmir. Orqanizm orqanlara malikdir, orqanlar toxumalardan ibarətdir, toxumalar hüceyrələrdən təşkil olunublar, hüceyrələr isə molekullardan əmələ gəliblər (Şəkil 1-4). Canlı sistemlərin birliyi çoxsaylı müxtəlif səviyyədə qarşılıqlı əlaqələrlə koordinasiya olunurlar: molekullar məlumatı orqandan orqana, hüceyrədən hüceyrəyə daşıyırlar və toxumalar hecyrələr tərəfindən ifraz olunmuş molekullarla başqa toxumaları təyin edir və inteqrasiya edirlər. Ümumiyyətlə, bizim fraqmentləşdirdiyimiz bioloji sistemlər bütün səviyyələrdə öz aralarında bir-biri ilə bağlıdırlar.

Amma, bioloji sistemləri öyrənmək üçün, biz verilmiş zamanda canlı sistemin kiçik bir hissəsini yoxlamalıyıq. Hüceyrənin biologiyası məntiqi başlanğıc nöqtədir, çünki orqanizmə mövcud olan avtonom bioloji vahidlərə hər şeydən yaxın olan, qarşılıqlı təsirdə olan hüceyrələrin təşkili kimi baxıla bilər. Yer üzündə bütün həyatın sonuncu ümumi əcdadı bir hüceyrə olub (bax Şəkil 1-1) və hüceyrə səviyyəsində bütün canlı aləm əhəmiyyətli dərəcədə oxşardır. Bütün hüceyrələr eyni molekulyar bloklardan, genetik informasiyanın saxlanılması, mühafizə olunması və ekspressiyası üçün oxşar metodlardan və enerji metabolizmi, molekulyar daşınma, siqnal yolları, inkişaf və quruluşun təmin olunması üçün oxşar proseslərdən istifadə edirlər.

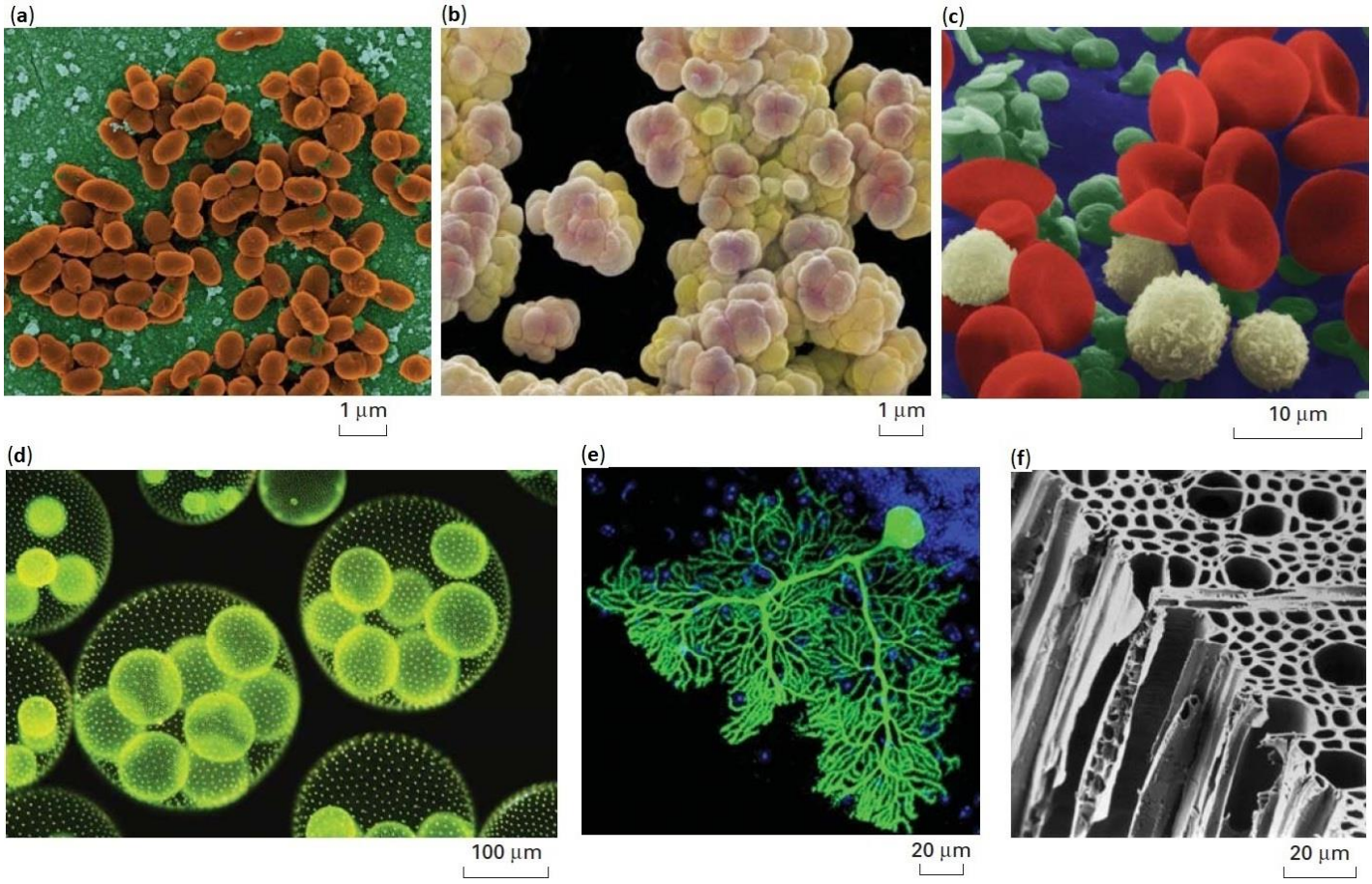


Şəkil 1-2 Çarliz Darvin (1809-1882) Darvin HMS Beagle gəmisindəki epik səyyahətindən dörd il sonra, artıq oz şəxsi qeyd kitablarında təbii seçmə haqqında öz konsepsiyasını formalaşdırmağa başlamışdır, və "*Növlərin Mənşəyi*" kitabında çap olunmalıdır (1859). [Çarliz Darvin Qalapaqos adalarında Howat Anderson (20-ci əsir)/Şəxsi kolleksiyasından, Bax və öyrən/Bridgements Images.]

Bu fəsildə biz hüceyrələrin ümumi xüsusiyyətlərini təsvir edirik. Biz bioloji sistemlərdə tapılmış əsas kiçik molekulların və makromolekulların qısa müzakirəsi ilə başlayacağıq. Sonra, hüceyrənin bugünkü orqanizmlərdə qorunub saxlanılmış quruluşunun və funksiyasının fundametal aspektlərini, və həyatın əsas molekulyar tərkibini öyrənmək üçün prokariot orqanizmləri (nüvəyə malik olmayan bir-hüceyrəli orqanizmlər) müzakirə edəcəyik. Sonra biz eukariot hüceyrələrin - nüvəyə malik olan hüceyrələrin quruluş və funksiyalarını, onların orqanoidlərinə diqqət yetirməklə müzakirə edirik. Bu müzakirənin ardınca, molekulyar hüceyrə biologiyasının tədqiqatlarında təkhüceyrəli eukariot orqanizmlərin istifadəsinə baxılacaq. Burada diqqət maya göbələyinə və malariyanı törədən orqanizmlərə yönələcək.

Biz artıq bir neçə min metazonanın (çoxhüceyrəli heyvanların) tam oxunmuş genom ardıcıllığına malikik, və bu ardıcıllıqlar genlərin və orqanizmlərin təkamülinə çoxlu miqdarda yeni bilikləri gətirmişdir. Bu fəsilin son bölməsi bizə göstərir ki, bu informasiya orqanizmlər arasındakı təkamülcə qohumluq əlaqələrini necə aydınlaşdırmaq və eləcə də insanın inkişafını necə anlamaq olar. Həqiqətən də bioloqlar təkamülü tədqiqat aləti kimi istifadə edirlər: əgər gen və onun kodlaşdırdığı zülal deyək ki, bütün metazoanlarda qorunub saxlanmışsa (konservativdirsə) amma, bir-hüceyrəli orqanizmlərdə tapılmamışsa, görünür zülal bütün metazoanlar üçün çox əhəmiyyətli rola malikdir, beləliklə tədqiqat üçün yararlı olan bütün çoxhüceyrəli orqanizmlərdə öyrənilə bilər.

Mtazoan hüceyrə tiplərinin çoxunun quruluşu və funksiyası konservativ olduğundan biz indi çox hüceyrə tiplərinin, o cümlədən əzələ və qaraciyər hüceyrələri, bağırsağın daxilini örtən epiteli hüceyrələrinin və dərini əmələ gətirən hüceyrələrin təbəqələrinin quruluşu və funksiyası barədə daha çox ətraflı anlayırıq. Amma, başqa tip hüceyrələr, xüsusən də immun və sinir sistemini əmələ gətirən çox tiplər hələ də sirr olaraq qalır; bu və digər hüceyrə sistemlərini və bədənimizi əmələ gətirən orqanları öyrənmək üçün daha çox əhəmiyyətli bioloji eksperimentlər aparılmalıdır.



ŞƏKİL 1-3 Hüceyrələr forma və ölçüsünə görə heyrətləndirici dərəcədə çeşidlərə malikdirlər. Hüceyrələrin bəzi morfoloji müxtəlifliyi bu fotoqrafiyada təsvir olunmuşdur. Hüceyrələr morfologiyalarından başqa hərəkət etmək qabliyyətinə görə, daxili təşkilliyinə (eukqariotlar prokariotlara qarşı) və metabolik fəaliyyətlərinə görə də fərqlənirlər. (a) Eubakteriya: *Lactococcus lactis*, Rokfor, Bri və Kamamber pendirlərinin istehsalında istifadə edilir. (b) Arxaelar kütləsi (*Methanosarcina*), karbon iki-oksidi və hidrogen qazını metan qazına çevirməklə enerji istehsal edirlər. Qaramalın mədəsində yaşayan bəzi bakteriyalar hər gün 150 litrə qədər metan qazını yarada bilirlər. (c) İnsanın qan hüceyrələri saxta rənglə göstərilmişdir. Qırmızı hüceyrələr oksigen daşıyıcı eritrositlərdir, ağ hüceyrələr (leykotsitlər) immun sisteminin bir hissəsidir və yoluxmaya qarşı mübarizə aparırlar, yaşıl hüceyrələr isə qan axmasını dayandırmaq üçün yaralarda qanlaxtalanmasını həyata keçirən trombositlərdir. (d) *Volvox aureus* bir hüceyrəli yaşıl yosunun əmələ gətirdiyi koloniyadır. Böyük kürələr çox fərdi hüceyrələrdən əmələ gəlmişdir, mavi və ya yaşıl nöqtələr kimi görünürlər. Daxildəki sarı nöqtələr, hər biri çox sayda hüceyrələrdən əmələ gəlmiş qız koloniyalardır. (e) Beyinciyin tək bir Purkince neyronu, öz şaxələnmiş dentritlər şəbəkəsi boyunca başqa hüceyrələrlə yüz minlərlə kontak əmələ gətirə bilirlər. Yaşıl fluoressent zülalın daxil edilməsi ilə hüceyrə görünə bilən vəziyyətə gətirilmişdir, yuxarı sağ tərəfdəki lampaya bənzər əsas hüceyrə cismidir. (f) Vazikulyar (damarlı) bitkilərdə bitki hüceyrələri sellüloza sitoskeletlə saxlanılan möhkəm şəkildə bir yerə sıxlaşmışlar. Hüceyrələr arasındakı boşluqlar su və qida daşıyan borucuqlarda birləşirlər. [(a)hissəsi Gary Gaugler/Science Source. (b) Hissəsi Power and Syred/Science Source. (c) Hissəsi Science Source. (d) Hissəsi micro_photo/iStockphoto/Getty Images-dən. (e) Hissəsi nəzakətlə Dr. Helen M. Blau (Stanford University School of Medicine) və. Clas B. Johansson-dan (Karolinska Institutet). (f) Hissəsi Biophoto Associates/Science Source.]

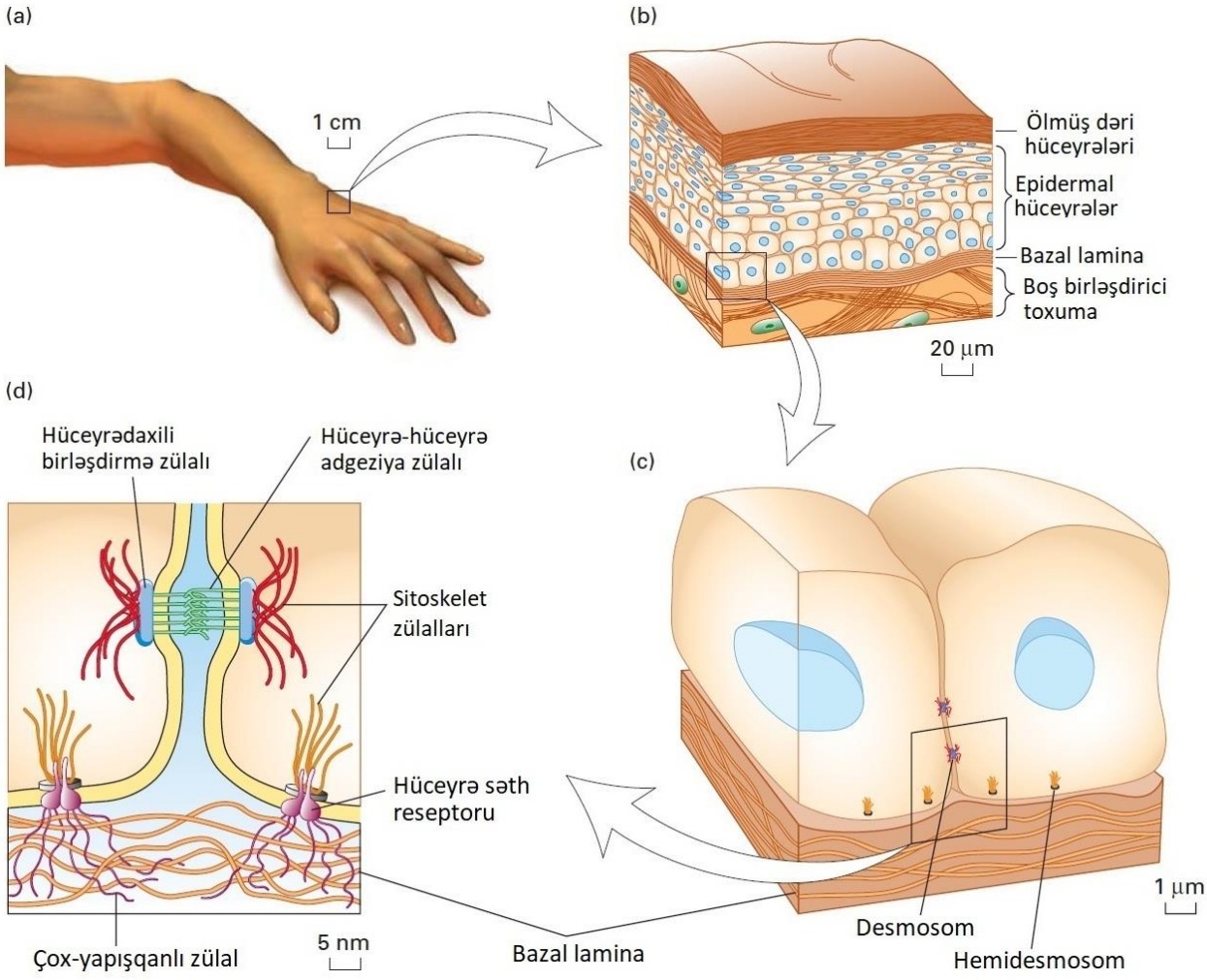
1.1 Həyat Molekulları

Böyük polimerlər molekulyar hüceyrə biologiyasının diqqət mərkəzi olduğu halda, kiçik molekullar bütün hüceyrə proseslərinin qurulduğu mərhələdir. Su, qeyri üzvi ionlar və geniş çeşiddə nisbətən kiçik üzvi molekullar (Şəkil 1-5) canlı materiyanın çəkiyə görə 75-80 faizini təşkil edir və su hüceyrənin həcminin 75 faizini təşkil edir. Su da daxil olmaqla belə kiçik molekullar hüceyrə daxilində baş verən çoxlu miqdarda reaksiyalar üçün, o cümlədən, enerji metabolizmi və hüceyrə siqnal sistemi üçün substrat rolunu oynayır. Belə kiçik molekulları hüceyrələr müxtəlif yollarla qəbul edirlər. İonlar, su və çoxlu miqdarda müxtəlif kiçik üzvi molekullar hüceyrəyə

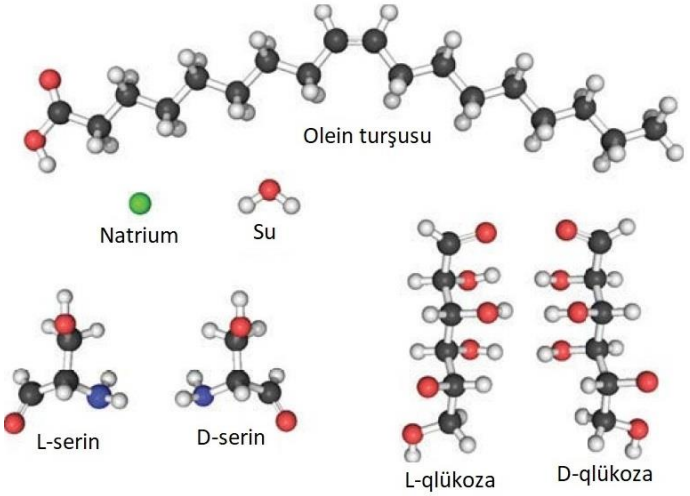
daşınır (Fəsil 11), başqa kiçik molekullar, çox hallarda ardıcıl kimyəvi reaksiyalarla hüceyrə daxilində sintez olunurlar (bax Fəsil 12).

Hətta, şəkərlər, vitaminlər və amin turşuları kimi çoxsaylı kiçik molekulların quruluşunda biz takamülün buraxdığı izi görürük. Məsələn, qlisindən başqa bütün amin turşuları asimmetrik karbon atomuna malikdir, amma heçvaxt D-stereoizomer deyil, yalnız L-stereoizomer zülallara daxil olur. Bunun kimi, yalnız qlikozanın D-stereoizomeri dəyişilməz şəkildə hüceyrədə tapılmışdır, heç zaman onun güzgüdəki əksi, L-stereoizomer (bax Şəkil 1-5) tapılamamışdır. Bioloji təkamülün erkən mərhələsində, bizim ümumi hüceyrə əcdadımız reaksiyanı hər iki stereoizomer əvəzinə yalnız bir stereoizomerlə kataliz etmək qabliyyətini yaratmışdır. Bu seçmənin necə baş verdiyi məlum deyil, amma indi bu seçimlər olduğu yerində blok olunmuşdur.

Qorunub saxlanılmış çox əhəmiyyətli və universal kiçik molekul **adenozin trifosfatr (ATP**), özünün iki kimyəvi rabitəsində tez əldə oluna bilən saxlanılmış kimyəvi enerjiyə malikdir (Şəkil 1-6). ATP-nin yüksək enerjiyə malik olan əlaqələrindən biri qırılarkən **adenozin difosfat** (ADP) əmələ gəlir, ayrılmış enerji isə enerji-tələb edən proseslərin, məsələn əzələ yığılmalarında və ya zülal sintezində və sair istifadə oluna bilir. ATP istehsalında enerjinin əldə olunması üçün bütün hüceyrələr qida molekullarını parçalayır. Məsələn, şəkər karbon iki-oksidə və suya qədər parçalanarkən şəkər molekulunun kimyəvi babitələrində saxlanılan enerji buraxılır və onun əksər hissəsi enerji ilə zəngin olan ATP sintezində tutula bilir. Bakterial, bitki və heyvan hüceyrələri hamısı bu proses vasitəsi ilə ATP istehsal edə bilir. Bundan əlavə, bitkilər və bir sıra başqa orqanizmlər ATP istehsal etmək üçün enerjini günəş işığından **fotosintez** yolu ilə toplaya bilirlər.



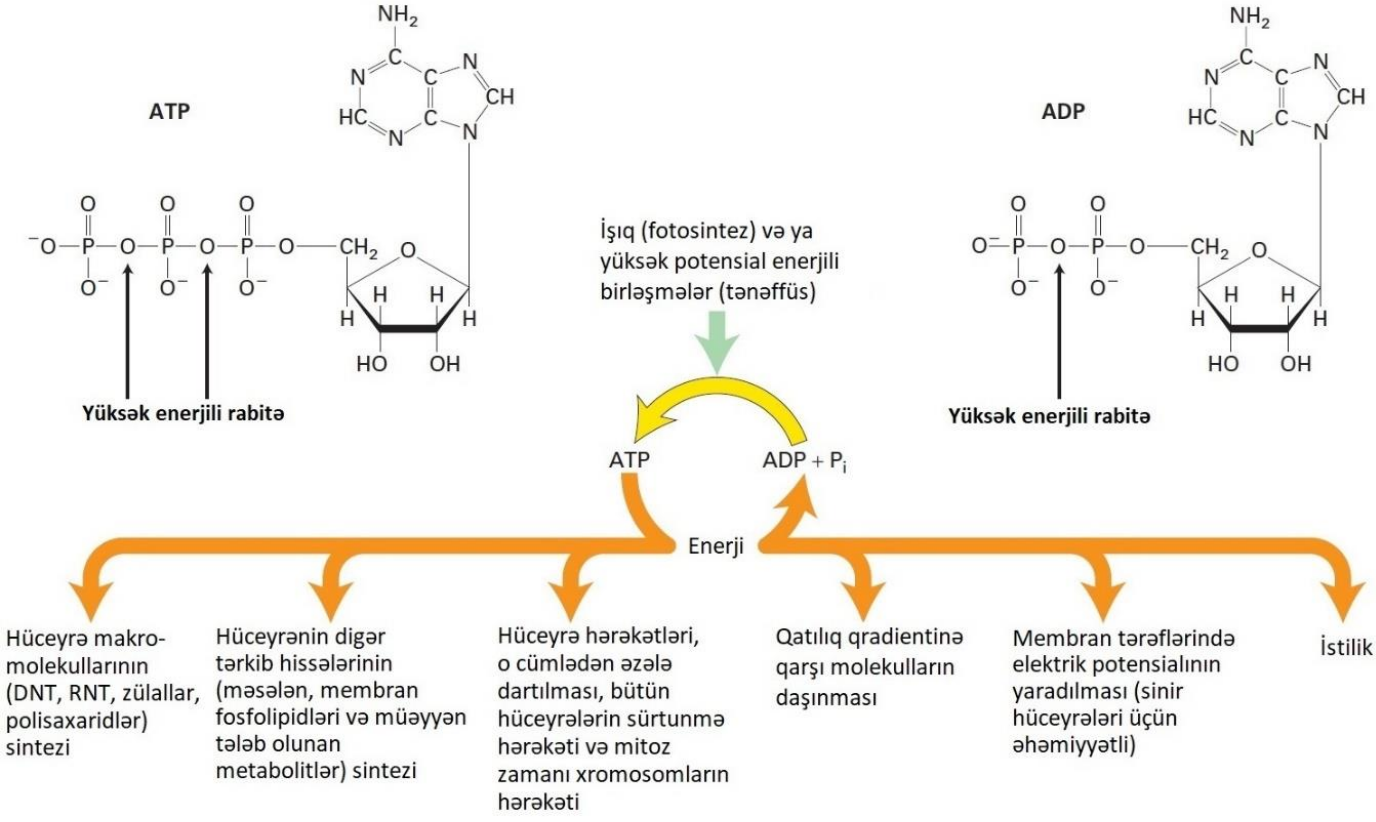
ŞƏKİL 1-4 İnsan bədəni kimi canlı sistemlər bir-biri ilə çox yaxın əlaqədə olan elementlərdən təşkil olunublar. (a) Bizim əlmizin səthi canlı orqan, bir-neçə qat toxumadan təşkil olunmuş dəri ilə örtülüdür. (b) Xarici bərk, ölü dəri hüceyrələrindən ibarət olan qat bədəni yaralanmalardan, yoluxmalardan və qurumaqdan (dehidrasiyadan) qoruyur. Bu qat daimi canlı epidermal hüceyrələr vasitəsi ilə yenilənir, bu hüceyrələr həmçinin tuku və heyvanlarda yunun və xəzi də yaradır. Nisbətən dərin (növbəti) qat əzələ və birləşdirici toxumalar dəriyə onun möhkəmliyini və həmahəngliyini verir. (c) Toxuma hüceyrə səviyyəsində yapışdırıcı quruluşlar (desmosomlar və hemidesmosomlar) hesabına formalaşır, onlar hüceyrələri bir-birinə və onlardan aşağıdakı dəstək edici liflərdən ibarət olan qata birləşdirir. (d) Hüceyrə yapışqanlığının (adheziyasının) əsasında onun quruluş komponenti: hüceyrə səthi membranını əmələ gətirən fosfolipid molekulları və böyük zülal molekulları durur. Hüceyrə membranından kəsib keçən zülal molekulları çoxsaylı zülallardan təşkil olunmuş, daxili və xarici lifləri əlaqələndirən bağları əmələ gətirirlər.



ŞƏKİL 1-5 Çoxsaylı kiçik molekullardan bir çoxu hüceyrələrdə tapılmışdır. Yalnız L-formalı amin turşuları, məsələn serin kimi, zülallarda birləşir, amma onun güzgüdəki əksi olan D-forma birləşmir. Yalnız D-formalı qlükoza metabolizmə girərək karbon iki oksidə və suya qədər parçalanır, amma onun güzgüdəki əksi olan L-forma girmir.

Digər kiçik molekullar (məsələn, müəyyən hormonlar və boy faktorları) hüceyrə fəaliyyətini istiqamətləndirən siqnal kimi fəaliyyət göstərirlər (Fəsil 15 və 16) və sinir hüceyrələri, bəzi müəyyən kiçik siqnal molekullarını buraxmaqla bir-biri ilə əlaqə yaradırlar (Fəsil 22). Bizim bədənimizə qorxu hadisələrinin çox güclü təsiri bədəndə kiçik-molekullu adrenalinin hormonunun birbaşa ani axını ilə əmələ gəlir, bu da "döyüş və ya uçuş" ("fight or flight") cavab treaksiyasını mobilizasiya edir.

Müəyyən kiçik molekullar (monomerlər) polimerlər adlanan makromolekulları yaratmaq üçün bir tip kovalent əlaqəli reaksiyanın təkraralanması ilə birləşə bilirlər. Hüceyrələr üç tip böyük makromolekulları istehsal edir: polisaxaridləri, zülalları və nuklein turşularını. Məsələn, şəkərlər polisaxaridləri istehsal etmək üçün istifadə olunan monomerlərdir. D-qlükozanın müxtəlif polimerləri bitki hüceyrə divarının selluloza komponentlərini və qlükozanın qaraciyərdə və əzələlərdə tapılmış ehtiyat forması olan qlikogeni yaradır. Makromolekulların sintezi üçün sələf kimi istifadə olunan kiçik molekulların müvafiq qatışıqlarının hazırlanmasında hüceyrə çox diqqətlidir.

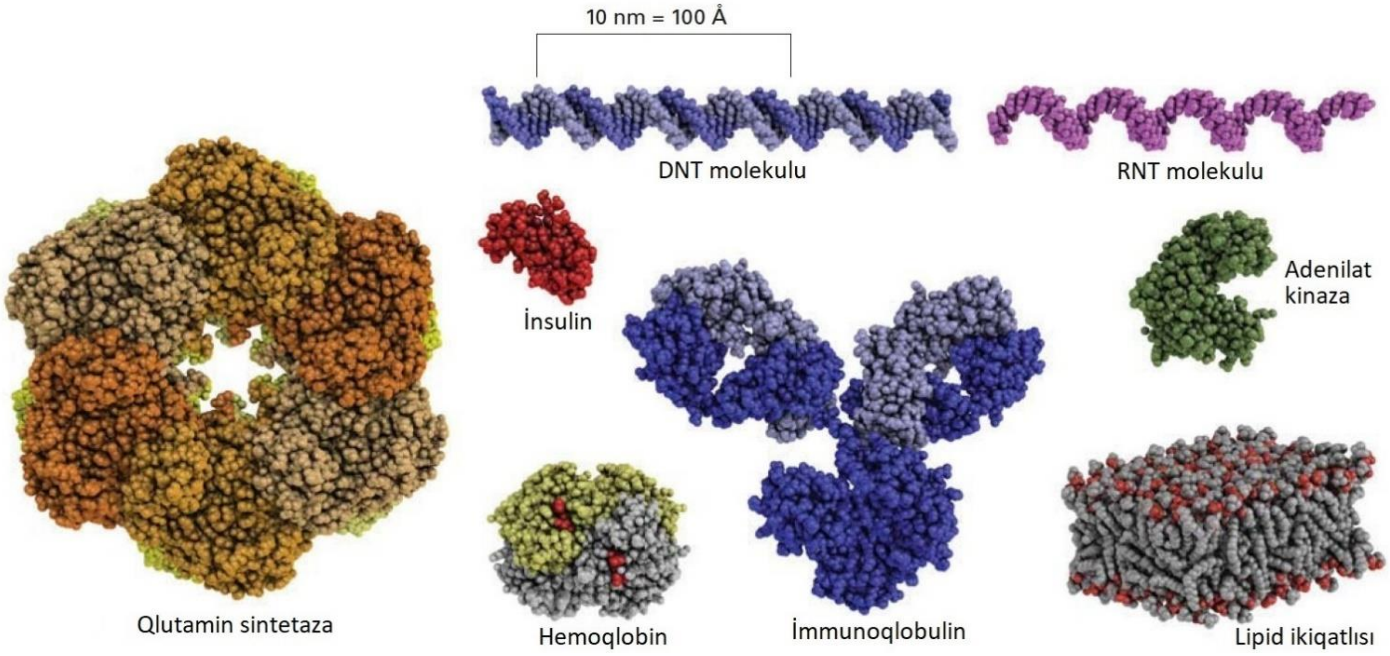


ŞƏKİL 1-6 Adenozintrifosfat (ATP) hüceyrələr tərəfindən enerjinin tutulması və ötürülməsi üçün ən çox istifadə olunan ümumi molekuldur. ATP adenozindifosfatdan (ADP) və qeyri üzvi fosfatdan (Pi) bitkilərdə fotosintez yolu ilə və hüceyrələrin çoxunda şəkərlərin və yağ turşularının parçalanmasından alınan enerji vasitəsi ilə əmələ gəlir. ATP-dən Pi ayrılması (hidrolizi) ilə çoxlu miqdarda hüceyrə prosesləri aparılır.

Zülallar Hüceyrəyə Quruluş Verir və Əksər Hüceyrə Tapşırıqlarını Həyata Keçirir

Zülallar, hüceyrənin "işçi atları", daha zəngin olan və funksiyasına görə daha geniş müxtəlifliyə malik olan hüceyrə makromolekullarıdırlar. Hüceyrələr 20 müxtəlif **amin turşusunu** hər biri müəyyən ardıcıllığa malik olan xətti zəncir şəkilində bir yerə düzərək, ümumi uzunluğu təxminən 100-1000 amin turşusu arasında olan zülalları yaradırlar (bax Şəkil 2-14). Polimerləşmə zamanı amin turşularının xətti zənciri mürəkkəb formada bükülərək zülalların fərqli üç-ölçülü quruluşunu və hər bir zülalın funksiyasını müəyyən edir (bax Şəkil 1-7). İnsanlar amin turşularını, onları ya başqa molekullardan sintez etmək yolu ilə, ya da yediyimiz zülalları parçalamaq yolu ilə əldə edirlər.

Zülallar hüceyrədə müxtəlif funksiyalara malikdirlər. Çoxsaylı müxtəlif zülallar **fermentlərdi**r, onlar kiçik molekulların və ya makromolekulların daxil edildiyi kimyəvi reaksiyaları sürətləndirirlər (kataliz edirlər) (bax Fəsil 3).



ŞƏKİL 1-7 Təmsil olunan bəzi zülal nümunələrinin ümumi miqyasda çəkilmiş modelləri lipid ikiqatlısının kiçik hissəsi, DNT molekulu və RNT molekulu ilə müqayisə olunur. Hər bir zülal, çoxsaylı kimyəvi rabitələrlə bir yerdə saxlanılmış, təyin edilmiş üçölçülü formaya malikdir. Təqdim olunan zülallara fermentlər (qlutamin sintetaza və adenilat kinaza), anticismlər (immunoqlobulin), hormon (insulin) və qanın oksigen daşıyıcısı (hemoqlobin) daxildir.

[Qlutamin sintetaza verilənləri H. S. Gill and D. Eisenberg, 2001, *Biochemistry* **40**:1903–1912, PDB ID 1fpy. Insulin verilənləri E. N. Baker et al., 1988, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol.Sci.* **319**:369–456, PDB ID 4ins. Hemoqlobin verilənlər G. Fermi et al., 1984, *J. Mol. Biol.* **175**:159–174, PDB ID 2hhb. Immunoqlobulin verilənlər L. J. Harris et al., 1998, *J. Mol. Biol.* 275:861–872, PDB ID 1igy. Adenilat kinaza verilənlər G. Bunkoczi et al., PDB ID 2c9y.]

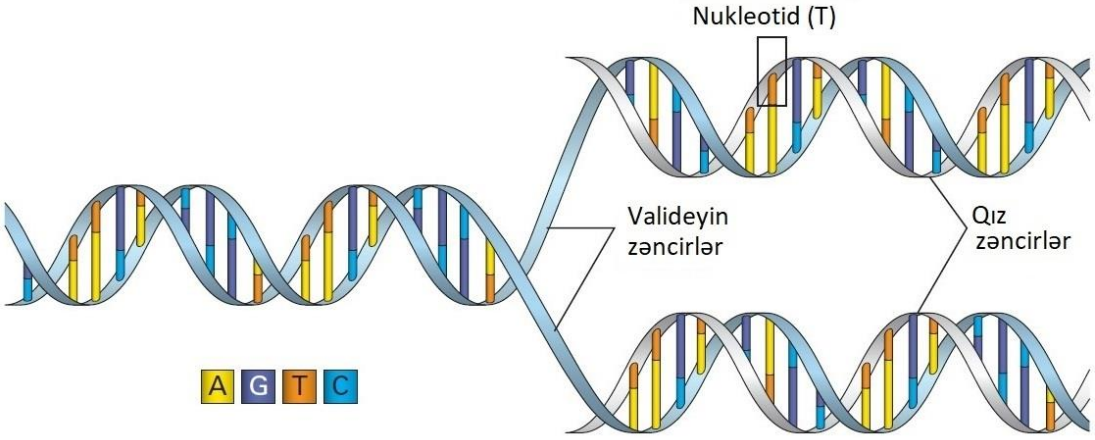
Müəyyən zülallar bütün zülalların sintezinin mərhələlərini kataliz edirlər, başqaları isə DNT və RNT kimi başqa makromolekulların sintezini katalzi edirlər. **Sitoskelet** (hüceyrə skelet) **zülalları** hüceyrənin quruluş elementləri rolunu oynayırlar, məsələn daxili skeleti yaratmaqla; digərləri, ATP rabitələrindəki enerjidən istifadə etməklə xromosom kimi hüceyrədaxili quruluşların, və hətta bütün hüceyrənin hərəkətinə güc verirlər (Fəsil 17 və 18). Bəzi zülallar bir-birinə yaxın qonşu hüceyrələri bir-birinə yapışdırır və ya hüceyrəxarici matrisanın bir hissəsini təşkil edirlər (bax Şəkiıl 1-4). Zülallar, hüceyrədə tempraturun, ion qatılığının dəyişməsi və ya hüceyrədə başqa xassələrin dəyişməsi zamanı sensor rolunu oynayaraq hüceyrənin formasının dəyişməsini həyata keçirir. Hüceyrə səth membranında (plazmatik membranda) yerləşmiş çoxlu miqdarda zülallar müxtəlif kiçik molekulları və ionları inport və eksport edir (Fəsil 11). İnsulin kimi bəzi zülallar hormondurlar, başqaları hormon üçün reseptorlardır ki, onlar da öz hədəf zülalına birləşərək xüsusi hüceyrə funksiyasının aspektlərini tənzimləyirlər. Zülalların digər əhəmiyyətli bir sinifi DNT-nin xüsusi seqmentlərini birləşdirir və genləri işə salır və ya dayandırır (Fəsil 9). Faktiki olaraq, molekulyar hüceyrə biologiyasının əsas hissəsi xüsusi hüceyrə tiplərində xüsusi zülalların funksiyalarının öyrənilməsindən ibarətdir.

Nuklein Turşuları Lazım Olan Zamanda və Lazım Olan Yerdə Zülalı Istehsal Etmək Üçün Kodlaşdırılmış Informasiyanı Daşıyırlar

Insanların diqqətini ən çox cəlb edən makromolekul dezoksiribonuklein turşusudur (DNT), onun funksional xassəsi onu hüceyrənin "master molekulu" edir. DNT nin ilk dəfə 1953-cü ildə Ceyms D. Uotson və Fransis H.C. Krik tərəfindən aşkar

edilmiş üçölçülü quruluşu iki uzun spiral zəncirdən ibarət olub ümumi bir ox ətrafında burularaq ikiqat spiralı əmələ gətirmişlər (Şəkil 1-8). DNTnin ikiqat spiral quruluşu, təbiətin yaratdığı ən möhtəşəm konstruksiyalardan biri, irsiyyətin ən kritik fenomenidir, genetik cəhətdən müəyyən edilmiş xarakterik xüsusiyyətləri nəsildən nəsilə ötürür.

DNT zənciri **nukleotidlər** adlanan monomerlərdən təşkil olunub, bunlar çox hallarda *əsaslar* kimi adlandırılır, çünki onların quruluşunda tsiklik üzvi əsas vardır (Fəsil 5). Qısaldılmış adları A, T, C və G olan dörd müxtəlif nukleotid birləşərək və bu zaman, əsas hissələri zəncirin özülündən daxilə tərəf istiqamətlənərək əsas cütünü əmələ gətirməklkə DNT zəncirini yaradırlar. İki zəncir əsaslar vasitəsi ilə bir yerə birləşirlər və burularaq ikiqat spiralı yaradırlar. Hər bir ikiqat DNT spiralı sadə konstruksiyaya malikdir: burada bir zəncirdə A olanda o biri zəncirdə T olur, bir zəncirdəki hər bir C isə o birindəki G ilə uyğun gəlir (bax Şəkil 1-8). Bu ki zəncirin belə **komplementar** uyğunluğu elə möhkəm olur ki, əgər komplementar zəncirlər uyğun duz qatılılğında və temperatur şəraitində bir-birindən ayrılarsa, sonra onlar spontan şəkildə yenidən geriyə qayıdaraq komplementarlıq üzrə birləşəcəklər. DNT-nin bu xassəsi, Fəsil 5-də öyrənəcəyimiz kimi, onun replikasiyası və irsi ötürülməsi üçün kritik əhəmiyyətlidir və DNT molekulunu öyrənmək üçün istifadə olunan metodların əsasında durur, bu da Fəsil 6-da ətraflı verilir.

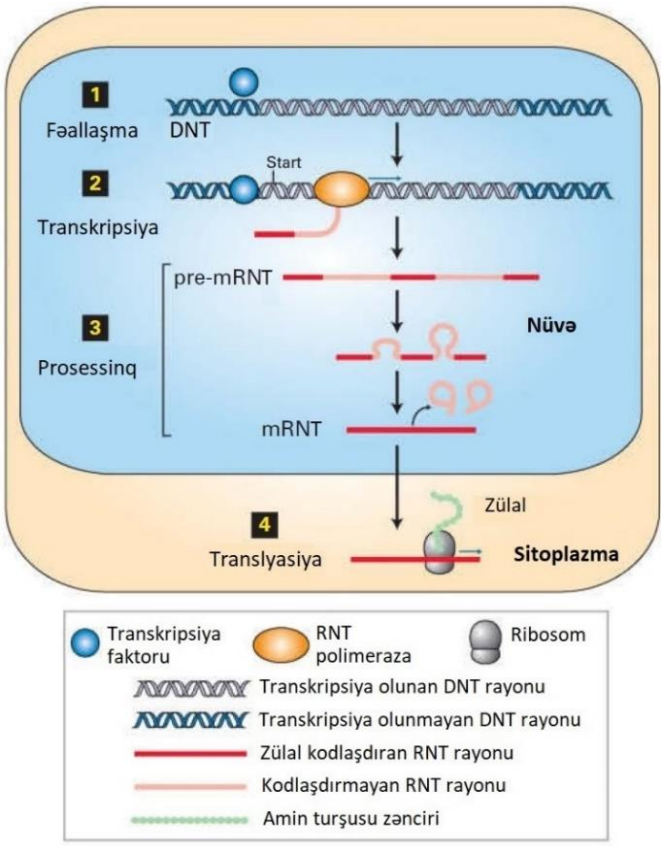


ŞƏKİL 1-8 DNT iki komplementar zəncirdən təşkil olunub, bir-biri ətrafında sarınaraq ikiqat spiralı əmələ gətirir. İkiqat spiral, A və T əsasları arasında və G və C əsasları arasında zəif hidrogen əlaqələri ilə stabilləşmişlər. Replikasiya zamanı iki zəncir bir-birindən açılır və komplementar zəncirləri yaratmaq üçün templeyt kimi istifadə olunurlar. Son məhsul orjinal ikiqat zəncirin iki eyni surətinin alınmasıdır, onlardan hər biri bir orjinal zəncirə və bir dənə də yeni qız (komplementar) zəncirə malik olur.

DNT qalıqlarının *ardıcıllığında* daşınan genetik məlumat zəncir boyu nukleotidlərin xətti düzülüşündən ibarətdir. DNT-nin, genlər adlanan xüsusi seqmentləri xüsusi zülalların istehsalı üçün təlimatı daşıyır. Ümumiyyətlə gen iki hissədən ibarətdir: zülalların spesifik aminturşu ardıcıllığına *uyğun olan kodlaşdırıcı rayon*; spesifik zülalların birləşərək zülalın nə vaxt və hansı hüceyrə tərəfindən istehsal olunacağına nəzarət edir *tənzimləyici rayon*.

Bakteriyaların əksəriyyəti bir neçə min zülal kodlaşdıran genə malikdir, maya və başqa birhüceyrəli eukariotlar təxminən 5000 genə malikdirlər. İnsan və başqa metazoanlar 13000-23000 arasında zülal kodlaşdıran genə malikdirlər, halbuki çox bitkilər daha artıq genə malikdirlər. Bu fəsildə bizim sonra müzakirə edəcəyimiz kimi, çox sayda bakterial genlər bütün canlı orqanizmlərdə qorunub saxlanmış konservativ zülalları kodlaşdırırlar. Bunlar universal olaraq hər yerdə rast gəlinən reaksiyaları kataliz edirlər, məsələn qlükozanın metabolizmi, nuklein turşularının və zülalların sintezi. Bakterial hüceyrələrdə aparılmış tədqiqatlar bu cürə əsas həyati proseslərdə dərin bilikləri əldə etdi. Buna bənzər olaraq, birhüceyrəli eukariotlarda, məsələn maya göbələyində çoxlu miqdarda genlər bütün eukariotlar üçün konservativ olan zülalları kodlaşdırır, biz xərçəng kimi insan xəstəliklərinə aid dərin bilikləri əldə edən hüceyrə bölünməsi kimi proseslərin öyrənilməsində maya göbələyinin necə istifadə olunduğunu görəcəyik.

DNT ardıcıllığında saxlanan informasiya necə istifadə olunur? Hüceyrələr kodlaşdırılmış informasiyanın DNT-dən zülala çevrilməsində iki əsas prosesi ardıcıl istifadə edir (Şəkil 1-9). **Transkripsiya** adlanan birinci prosesdə genin kodlaşdırıcı rayonunun surəti bir-zəncirli ribonuklein turşusuna (RNT) köçürülür, hansı ki, onun ardıcıllığı ikizəncirli DNT spiralının bir zənciri ilə eyni olur. RNT polimeraza adlanan çox böyük ferment DNT zəncirini templeyt kimi istifadə edərək RNT zəncirinin yaranmasında nukleotidlər arasındakı əlaqələri kataliz edir. Eukariotik hüceyrələrdə ilkin RNT məhsul prosessinqdən keçərək kiçik məlumat RNT (mRNT) molekuluna çevrilir və nüvədən sitoplazmaya keçir. Burada, **ribosom**, RNT və zülallardan təşkil olunmuş çox böyük kompleks (mürəkkəb) molekulyar maşın, **translyasiya** adlanan ikinci prosesi həyata keçirir.



ŞƏKİL 1-9 DNT-də kodlaşdırılan məlumat çoxmərhələli proseslə zülalların aminturşu ardıcıllığına çevrilir. Pillə 1: Transkripsiya faktorları spesifik genlərin tənzimləyici rayonlarına birləşərək onlara nəzarət edir və fəallaşdırır. Pillə 2: DNTyə birləşmiş çoxzülallı inisiasiya kompleksinin yığılmasının ardınca RNT ploimeraza, spesifik yerdə, start saytında fəallaşmış genin transkripsiyasına başlayır. Polimeraza, DNT zəncirlərindən birini templeyt kimi istifadə edib DNT boyu hərəkət edərək nukleotidləri birzəncirli səlәf-mRNT transkritində birləşdirir. Pillə 3: Kodlaşdırmayan ardıcıllıqları uzaqlaşdırmaq üçün ilkin transkript prosessinq olunur. Pillə 4: Eukariotik hüceyrədə yetişmiş məlumat RNT (mRNT) sitoplazmaya keçir, orada o, ribosomlarla birləşir və ribosom onun ardıcllığını oxuyaraq amin turşularını xətti zəncirdə kimyəvi birləşdirərək zülalı yığır.

Translyasiya zamanı ribosom genetik koda uyğun olaraq mRNT molekulu ilə diktə olunmuş ardıcıllıqla amin turşularını bir yerə yığaraq onlar arasında rabitəni yaradır. Biz, transkripsiyanı və translyasiyanı həyata keçirən hüceyrə komponentlərini Fəsil 5-də öyrənirik.

RNT informasiyanı nüvədən sitoplazmaya ötürmək rolundan başqa, molekulyar maşını qurmaq üçün karkas rolunu da oynayır. Məsələn, ribosom, kifayət qədər dəqiq və effektli RNT oxuyan və zülal sintez edən maşını yaratmaq üçün 50-dən çox zülalı özündə birləşdirən dörd RNT zəncirindən qurulmuşdur. Hüceyrədə kimyəvi reaksiyaların çoxu zülallarla kataliz olunduğu halda, çox az reaksiya, məsələn zülalların sintezində amin turşularını birləşdirən peptid əlaqələri RNT molekulları tərəfindən kataliz olunur.

İnsan genomu tam oxunana qədər aydın idi ki, insan DNT-sinin yalnız 10 faiziə qədəri zülal kodlaşdırır, və uzun illər boyu genomun qalan 90 faizi "tullantı DNT" hesab edilirdi! Amma, son illər biz öyrəndik ki, "tullantı DNT" adlandırılan hissənin çoxu minlərlə RNT molekullarına köçürülür və baxmayaraq ki, bunlar zülalları kodlaşdırmırlar, amma onlar hüceyrədə buna bərabər əhəmiyyətli məqsədlərə xidmət edirlər (bax Fəsil 10). Amma, hal hazırda biz bu zəngin kodlaşdırmayan RNT-lərin çox az hissəsinin funksiyasını bilirik.

Fermentlər kimi, ribozimlər adlanan müəyyən RNT molekulları, ribosom içərisindəki RNT nümunəsi kimi kimyəvi reaksiyaları kataliz edirlər. Çox alimlər *RNT dunyası* nəzəriyyəsini dəstəkləyirlər, bu nəzəriyyəyə görə hesab edirlər ki, öz-özünü replikasiya edə bilən RNT molekulları indiki həyat formasının əcdadlarıdır (sələfidirlər); million illər öncə RNT dünyası inkişaf edərək tədricən bu günki orqanizmlərin DNT, RNT və zülal dünyasına keçmişdir.

Bütün orqanizmlər genlərinin harada və nə zaman transkripsiya oluna biləcəyinə nəzarət etməlidir. Demək olar ki, bizim bədənimizdə bütün hüceyrələr insan genlərinin tam dəstinə malikdirlər, amma hər bir hüceyrə tipində bu genlərdən yalnız bəziləri fəaldır və ya işə salınıb zülal istehsal edir. Məsələn, qaraciyər hüceyrələri böyrək hüceyrələrinin istehsal etmədiyi bəzi zülalları istehsal edir və ya əksinə. Hələ bundan başqa, çoxsaylı hüceyrələr xarici siqnallara və ya ətraf mühitin dəyişikliklərinə xüsusi genlərin işə salınması və ya dayandırılması ilə cavab verirlər və beləliklə onlar öz zülallarının repertuarını mövcud tələbatlarını ödəmək üçün uyğunlaşdırırlar. Genlərin fəallığına bu cürə nəzarət, **transkripsya faktorları** adlandırılan DNT birləşdirən zülallardan asılıdır, Fəsil 9-da müzakirə olunduğu kimi, bu zülallar DNT üzərində xüsusi ardıcıllığa birləşərək xüsusi genlərin transkripsiyasını fəallaşdırmaq və ya dayandırmaqla keçiricilər rolunu oynayırlar.

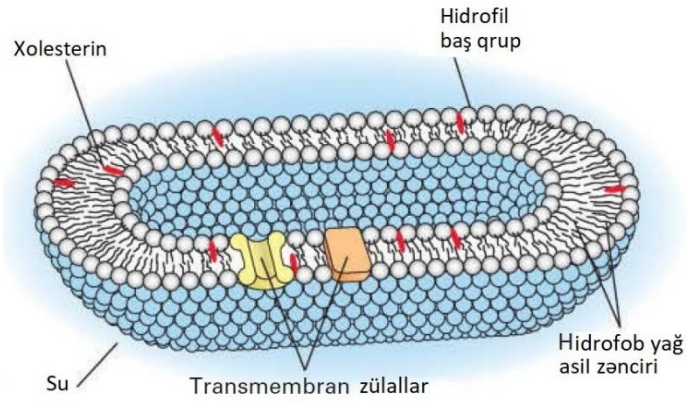
Fosfolipidlər Bütün Hüceyrə Membranlarının Konservativ Tikinti Bloklarıdır

Bütün orqanizmlərdə hüceyrə membranları ilk növbədə ikiqatlı (iki təbəqə) phospholipid molekullarından təşkil olunublar. Bu, ikitərəfli molekullar "suyu-sevən" (hidrofil) "baş" sonluğa və "suyu sevməyən" (hidrofob) "quyruq" sonluğa malikdir. Membranın iki fosfolipid təbəqələrinin hidrofil sonluqları membranın daxili və xarici səthinə tərəf istiqamətlənmişlər, hidrofob sonluqlar isə membran təbəqəsinin daxilinə tərəf batmışlar (Şəkil 1-10). Kiçik miqdarda olan başqa lipidlər, məsələn xolesterin, bu fosfolipid karkasın daxilinə keçmişlər. Hüceyrə membranları hüceyrənin ölçüsü ilə müqayisədə həddən artıq nazikdir. Əgər bakteriya və ya maya hüceyrəsini 10000 dəfə, futbol topu ölçüsünə qədər böyüdüb çatdırsaq, o zaman plazma membranı bir kağız vərəqi qədər nazik olacaqdır.

Fosfolipid membranlar suyu, bütün ionları və virtual olaraq bütün hidrofil kiçik molekulları keçirmirlər. Beləliklə hər bir hüceyrədə olan hər bir membran, xüsusi ionların və kiçik molekulların membranı kəsib keçməsinə imkan yaradan zülallar qrupuna malikdirlər. Başqa membran zülalları hüceyrələri başqa hüceyrələrə və ya onları əhatə edən polimerlərə yapışmağa (bərkitməyə) xidmət edir; digər zülallar isə hüceyrəyə forma verir və ya onlara onlara formasını dəyişməyə imkan verir. Biz membranlar haqqında və molekulların onları necə kəsib keçməsi barədə detalları Fəsil 7 və 11-də öyrənəcəyik.

Yeni hüceyrələr həmişə hüceyrə bölünməsi yolu ilə valideyin hüceyrələrdən törəyir. Biz gördük ki, yeni DNT molekullarının sintezi iki valideyin DNT zəncirlərinin templeyt kimi istifadə olunması ilə elə baş verir ki, hər bir qız DNT molekulu valideyin DNT molekulu ilə eyni ardıcıllığa malik olur.

Paralel olaraq, membranlar da lipidlərin və zülalların valideyinhüceyrənin mövcud olan köhnə membrana birləşməsi ilə yaranır və bunlar parçalanaraq qız hüceyrələr arasında bölünürlər. Beləliklə membranın sintezi də DNT sintezinə oxşar olaraq valideyin membran quruluşunun templeyt kimi istifadə olunması ilə baş verir.



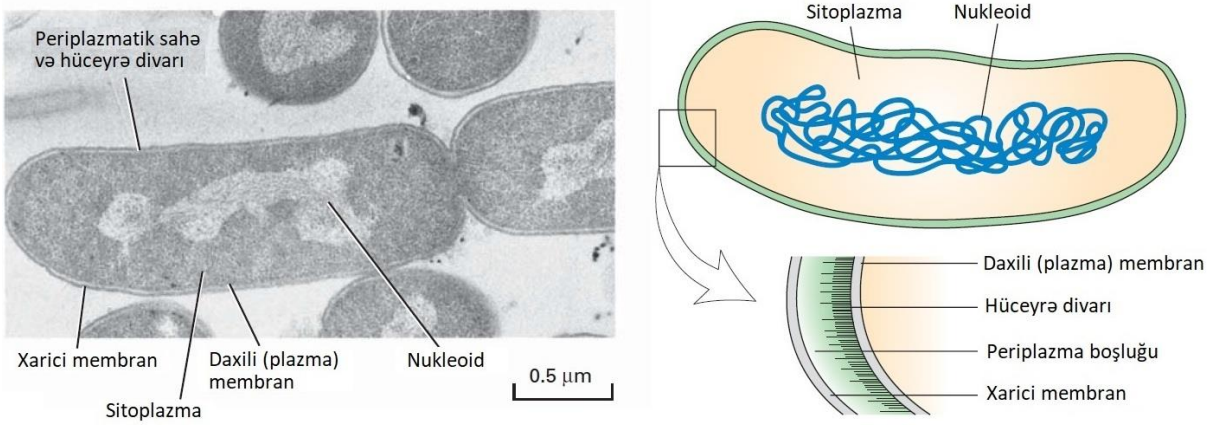
ŞƏKİL 1-10 Hüceyrənin sulu daxili fosfolipidlərin iki-qatlı örtüyü olan plazma membranı ilə əhatə olunmuşdur. Fosfolipid molekulları hidrofob yağ turşusu zənciri ilə membranın içərisinə tərəf istiqamətlənmişdir (qara dalğalı xətlər) və onların hidrofil baş qurupları (ağ kürələr) kənara membran səthlərinə doğru baxır. Beləliklə, membranın hər iki tərəfində baş qruplarl düzülmüşlər, əsasən yüklənmiş fosfatlar hüceyrənin daxilində və xaricində sulu səthə bitişik olan səthdə düzülümüşlər. Bütün bioloji membranlar eyni əsas ikitəbəqəli fosfolipid quruluşa malikdirlər. Xolesterin (qırmızı) və müxtəlif zülallar lipid ikitəbəqəsinə yüklənmişlər. Membranın daxili ara boşluğu plazma membranın həcmi ilə nisbətdə bu diaqramda göstəriləndən çox böyükdür.

1.2 Prokariot Hüceyrənin Quruluşu və Funksiyası

Bütün bioloji kainat (dunya) iki tip hüceyrədən təşkil olunub – prokariot və eukariot hüceyrələr. Bakterialar kimi prokariot hüceyrələr, plazma membranla əhatə olunmuş vahid qapalı hissədən ibarətdir, formalaşmış nüvəsi yoxdur və nisbətən sadə daxili təşkilliyə malikdir (Şəkil 1-11). Eukariot hüceyrələr prokariotlardan fərqli olaraq, tam formalaşmış membranla-bağlı nüvəyə və **orqanoidləri** örtən geniş daxili membranlara malikdir (Şəkil 1-12).

Prokariotlar Iki Aləmdən Təşkil Olunublar: Arxealar və Eubakteriyalar

Son illər, müxtəlif prokariot orqanizmlərdə DNT ardıcıllıqlarının ətraflı analizləri iki prokariotlar aləminin olduğunu aşkar etdi: eubakteriyalar, bunlar çox zaman sadəcə olaraq "bakteriyalar" adlandırılır və arxealar. Eubakteriyalar çoxsaylı prokariot tipləri olub bir-hüceyrəli orqanizmlərdir; bunlara sianobakteriyalar və ya göy-yaşıl yosunlar aiddirlər, bunlar birhüceyrəli və ya hüceyrələrin filament zəncir şəkilində düzülüşündən ibarət olurlar. Şəkil 1-11 tipik eubakterial hüceyrənin ümumi quruluşunu göstərir. Bakterial hüceyrələr ümumilikdə (orta hesabla) 1-2 µm ölçüdə olub sitoplazmaya və onu əhatə edən plazma membranına malik olan bir örtüklü hissədən (bölmədən) ibarətdirlər. Genom tək dairəvi DNT molekulundan ibarətdir, çox prokariotlar *plazmidlər* adlanan əlavə kiçik dairəvi DNT molekulların malik olurlar. Bakterial hüceyrələr müəyyən olunmuş tam nüvəyə malik olmasalar da, vahid dairəvi DNT genom sıx şəkildə bükülərək hüceyrənin nukleoid adlanan mərkəzi rayonunda kondensasiya olunur. Bunun əksinə, ribosomların çoxu sitoplazmada tapılmışdır. Bəzi bakterialar hüceyrə membranında ***mezosomlar*** adlanan invaqinasiyaya malik olurlar ki, bu da DNT sintezi və zülalların ifrazı ilə bağlıdır. Çox zülallar sitozol daxilində və ya plazma membranıda yerləşirlər, bu dəqiq daxili orqanizasiyanın olduğunu göstərir. Eukaritlardakından fərqli olaraq (bax Şəkil 1-9) bakterial mRNT-lər istənilən hər hansı bir prosesinqdən məhrumdurlar. Həmçinin bakterial DNT ilə sitoplazma arasında membran baryeri olmadığından artıq mRNT molekullarının bir hissəsi sintez olunarkən ribosomlar dərhal ona birləşirlər, beləliklə də, prokariotlarda transkripsiya və translyasiya eyni zamanda davam edə bilir.



ŞƏKİL 1-11 Prokariot hüceyrələr nisbətən sadə quruluşa malikdirlər. (*Solda*) Ümumi bağırsaq bakteriyası (çöpü) *Escherichia coli*-nin nazik kəsiyinin elektron mikrofotosu. Bakterial DNT-dən təşkil olunmuş nukleoid membranla örtülməmişdir. *E. coli* və başqa qram-mənfi bakteriyalar periplazma boşluğu ilə ayrılmış iki membranla əhatə olunmuşlar. Nazik hüceyrə divarı daxili membrana yaxındır (yapışmışdır). (*Sağda*) Rəssamın çəkdiyi bu şəkil nukleoidi (göy) və sitoplazmanı əhatə edən böyüdülmüş qatları göstərir. Hüceyrə əsasən sudan, zülallardan, ionlardan, və bu şəkil miqyasında göstərmək üçün çox kiçik olan başqa molekullardan təşkil olunub. [Elektron mikrofoto nəzakətlə L.D.J. Burdett və R.G.E Murray tərəfindən verilib.]

Bakterial hüceyrələr plazma membranın xarici tərəfinə sıx yapışmış hüceyrə divarına malik olurlar. Hüceyrə divarı, zülalların və oliqosaxaridlərin kompleksindən ibarət olan peptidoqlikan təbəqələrdən təşkil olunub, o hüceyrənin mühafizə olunmasında və formasının saxlanmasında rol oynayır. Bəzi bakteriyalar (məsələn *E. coli*) çox nazik daxili hüceyrə divarına malikdir və xarici membran daxili hüceyrə divarından periplazma boşluğu ilə ayrılmışdır. Belə bakteriyalar Qram metodu ilə rənglənmirlər və ona görə də Qram mənfi kimi təsnifləşdirilirlər. Başqa bakteriyalar (məsələn (*Bacillus polymyxa*) daha qalın hüceyrə divarına malik olurlar və onlarda xarici membran olmur, Qram rənglənməni götürürlər, ona görə də Qram-müsbət kimi təsnifləşdirilirlər.

Arxeaları eubakteriyalardan ayran DNT ardıcıllığı fərqlərindən başqa, arxaealarda tərkibinə görə eubakteriyalarda və eukariotlarda olan membranlardan fərqlənən hüceyrə membranları vardır. Çox arxealar qeyri adi ətraf mühit şəraitində, çox hallarda ekstremal mühit şəraitində artırlar, bu da yer üzərində həyatın ilk yarandığı qədim şəraiti xatırladır. Məsələn, halofitlər ("duzu sevənlər") sağ qalmaq üçün yüksək duz qatılığını tələb edirlər, termoasidofillər ("istiliyi və turşuluğu sevənlər") isə isti (80ºC) sulfatlı bulaqlarda, pH 2-dən aşağı olan mühitdə çoxalırlar. Hələ də başqa arxealar oksigensiz mühitdə yaşayır və suyu karbon-iki-oksidlə birləşdirməklə metan (CH_4) istehsal edirlər.

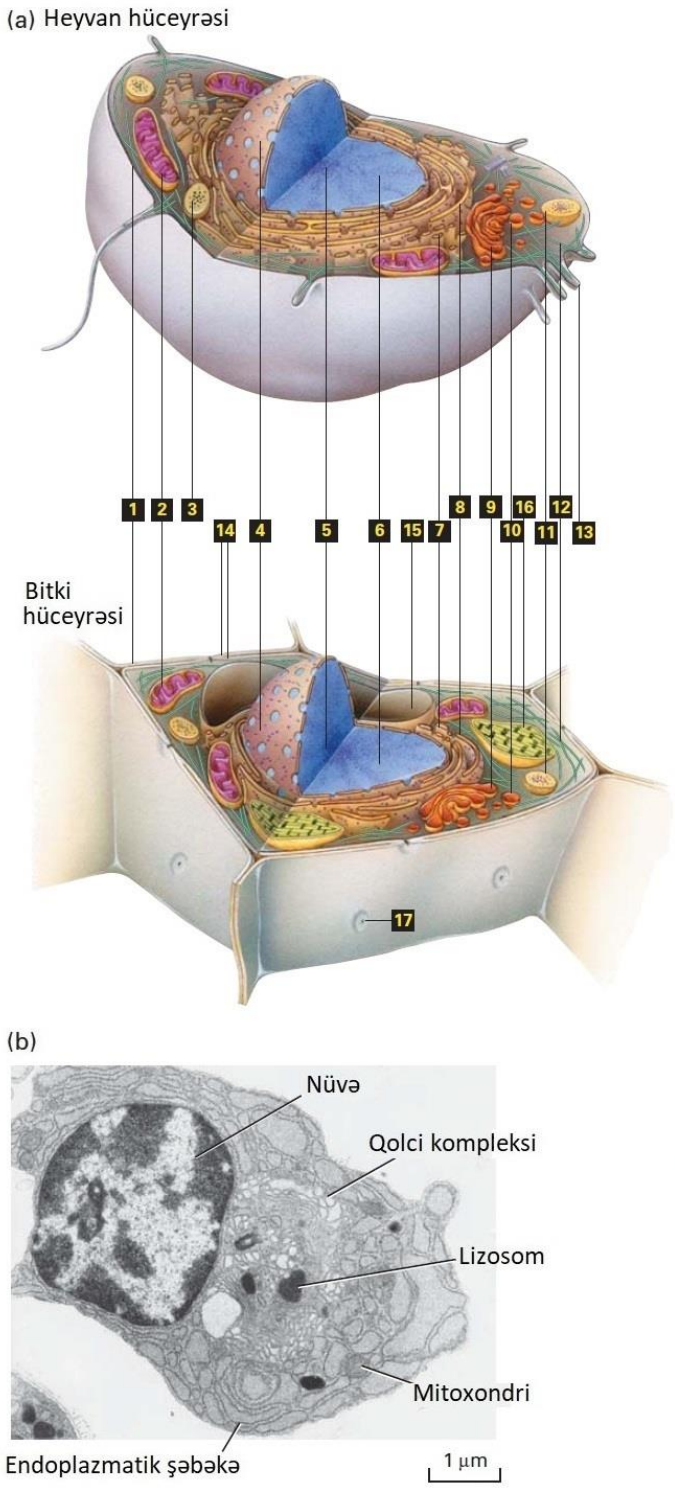
Escherichia coli Bioloji Tədqiqatlarda Geniş İstifadə Olunur

Bakterial hüceyrə xəttinə, çox gözəl eksperimental orqanizm olan və təbiətdə həm torpaqda həm də məməlilərin bağırsağında çox geniş yayılan *Escherichia coli* daxildir. *E. coli* və bir sıra başqa bakteriyalar eksperimental orqanizmlər kimi çoxsaylı üstünlüklərə malikdirlər. Onlar, qlükoza və duzlardan ibarət olan sadə və ucuz başa gələn mühitdə sürətlə çoxalırlar və bu sadə mühitdə bütün lazım olan amin turşularını, lipidləri, vitaminləri, və digər əhəmiyyətli kiçik molekulları özləri sintez edə bilirlər. Bütün bakterialar kimi *E. coli* də, gen fəallığının nəzarəti üçün, indi yaxşı başa düşülən çox incə mexanizmə malikdir (bax Fəsil 9). Uzun zamandır ki, tədqiqatçılar bu orqanizmlərin genetik analizi üçün çox güclü sistemlər hazırlamışlar. Bu sistemlər kiçik ölçülü bakterial genomun olması ilə, asanlıqla əldə oluna bilən mutasiyalarla, genlərin bakterialara keçirilməsi üçün metodların mümkün olması ilə, bakterial genlərin və zülalların funksiyasını tənzimlənməsi üzrə həddən artıq böyük zənginliyə malik təcrübələrin və biliklərin olması ilə, və bakterial genomda bir-birinə olan yaxınlığına görə genlərin xəritələşdirilməsinin kifayət qədər sadəliyi ilə təmin olunmuşlar. Fəsil 6-da *E. coli*-nin rekombinant DNT tədqiqatlarında necə istifadə olunduğunu görəcəyik.

CƏDVƏL 1-2 Molekulyar Hüceyrə Biologiyası Tədqiqatlarında İstifadə Olunan Ardıcıllığı Tam Oxunmuş Orqanizmlərin Genom Ölçüləri

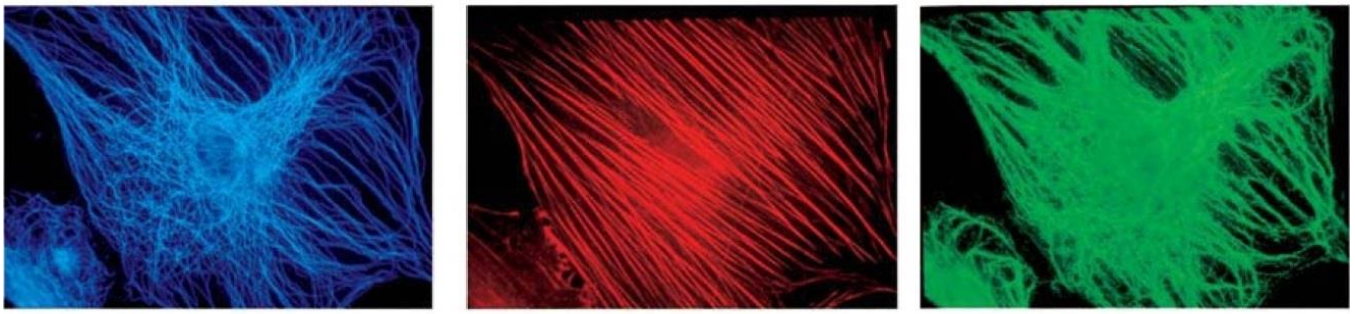
	Əsas cütləri (million)	Kodlaşdırılan zülalların təxmini sayı*	Xromosom**	Sitat
Eubakteriyalar				
Mycoplasma genitalum	0.58	500	1	a
Helicobacter pylori	1.67	1500	1	a
Haemophylus influenza	1.83	1600	1	a
Escherichia coli	4.64	4100	1	a
Basillus subtilis	4.22	4200	1	a
Arxealar				
Methanococcus jannaschii	1.74	1800	3	a
Sulfolobus solfataricus	2.99	3000	1	a
Bir-Hüceyrəli Eukariotlar				
Saccharomyces cerevisiae	12.16	6700	16	b
Chlamydomonas reinhardtii	120.4	14400	17	b
Plasmodium falciparum	23.26	5400	14	b
Çoxhüceyrəli Eukariotlar (Metazoanlar)				
Drosophila melanogaster	168.74	13900	6	b
Caenorhabditis elegans	100.29	20500	6	b
Schmidtea mediterranea (planarian)	480	>20000***	4	c
Danio rerio (zebrafiş)	1412	26500	25	b
Gallus gallus (toyuq)	1072.54	15500	33	b
Mus musculus	3480.96	23100	21	b
Homo sapiens	3326.74	20800	24	b
Arabidopsis thaliana	135.67	27400	5	b

* Kodlaşdırılan zülalların sayı 100-ə qədər yuvarlaqlaşdırılmış genom DNT ardıcıllığına əsaslanan ən yaxın cari hesablamalardır. Ehtimal olunur ki, onlar eubakterialarda və arxealarda çox kiçik zülalları kodlaşdıran yeni aşkar olunan genlərin daxil edilməsi ilə və eukariotlarda yeni aşkar olunan kiçik genlərin və ekspressiya olunmayan psevdogenlərin əlavə olunmasına görə bir qədər dəyişəcəklər.
** Metazoanlarda fərqli cinsiyyət xromosomları da daxil olmaqla eukariotlarda yalnız nüvə xromosomları sayılır.
*** Ehtimal olunan qiymət
MƏNBƏYİ:
a, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/;
b, http://ensemblgenomes.org/;
c, http://www.genome.gov/12512286.



1. Plazma membranı molekulların hüceyrə daxilinə və xaricinə hərəkətinə nəzarət edir və hüceyrə-hüceyrə siqnal ötürülməsində və adgeziyasında fəaliyyət göstərir.
2. İki membranla əhatə olunmuş mitoxondri qlükozanı və yağ turşularını oksidləşdirərərk ATP istehsal edir.
3. Turş lümeni olan lizosomlar hüceyrə daxilinə mənimsənilmiş materialları və köhnəlmiş hüceyrə membranlarını və orqanoidləri dağıdır.
4. İki membranlı nüvə qabığı nüvə tərkibini əhatə edir; xarici nüvə membranı qırışlı ER membranın davamıdır.
5. Nüvəcik hüceyrənin əsas rRNT-lərinin sintez olunduğu nüvə subkompartmentidir.
6. Nüvə mRNT və tRNT sintezi saytı olan DNT və zülallardan təşkil olunmuş xromatinlə doludur.
7. Hamar ebdoplazmatik şəbəkə (ER) lipidləri sintez edən və müəyyən hidrofob molekulları zərərsizləşdirən fermentlərə malikdir.
8. Qırışlı endoplazmatik şəbəkə (ER) ifraz olunan zülalların, lizosomal zülalların və müəyyən membran zülallarının sintezində, prosessinqində və çeşidlənməsində fəaliyyət göstərir.
9. Qolci kompleksi qırışlı ER-də sintez olunan ifrazat zülallarını, lizosomal zülalları və membran zülallarını prosessinq edir və çeşidləyir.
10. İfrazat qovucuqları ifraz olunan zülalları çeşidləyir və tərkibindəkiləri buraxmaq üçün plazma membranı ilə qovuşur.
11. Peroksisomlar yağ turşularını biosintez zamanı istifadə edilən kiçik molekullara parçalayan və bəzi molekulları zərərsizləşdirən fermentlərə malikdir.
12. Sitoskelet liflər hüceyrə membranlarına dayaq olan şəbəkə və bağları əmələ gətirir, orqanoidlərin təşkilinə kömək edir və hüceyrənin hərəkətində iştirak edir.
13. Mikrovillər ətraf mühitdən qida maddələrinin sorulması üçün səth sahəsini artırırlar.
14. Hüceyrə divarı, əsasən sellülozadan təşkil olunub, hüceyrə formasının saxlanılmasına kömək edir, mexaniki stresə qarşı müdafiəni təmin edir.
15. Vakuol ehtiyat suyu, ionları və qida maddələrini saxlayır, makromolekulları parçalayır və böyümə zamanı hüceyrə elonqasiyasında fəaliyyət göstərir.
16. Fotosintezi həyata keçirən xloroplastlar ikiqat membranla əhatə olunmuşlar və daxili membranla-bağlı kisələrə malikdirlər.
17. Plazmodesmata hüceyrə divarını kəsib keçən və bitişik bitki hüceyrələrinin sitoplazmalarını birləşdirən borucuq şəkilli hüceyrə qovşaqlarıdır.

ŞƏKİL 1-12 Eukariotik hüceyrələrin subhüceyrə təşkili. (a) "Tipik" heyvan hüceyrəsinin (*yuxarıda*) və bitki hüceyrəsinin (*aşağıda*) sxematik görünüşü. Bütün hüceyrə tipləri heç də bütün orqanoidlərə, qranulalara və burada göstərilən fibrilyar quruluşlara malik deyillər, başqa hüceyrə tiplərində baqa subquruluşlar movcud ola bilər. Hüceyrələr həmçinin formalarına görə, müxtəlif orqanoidlərin və subquruluşların qabarıqlığına görə də əhəmiyyətli dərəcədə fərqlənirlər. (b) Anticismləri ifraz edən ağ qan hüceyrə tipi olan plazma hüceyrələrinin elektron mikrofotosu bəzi daha böyük orqanoidləri göstərir. [(b) hissəsi nəzakətlə I. D. J. Burdett and R. G. E. Murray-dən.]



ŞƏKİL 1-13 Üç tip sitoskelet filamentlər məməlilərin hüceyrəsi daxilində xarakterik paylanmaya malikdirlər. Eyni hüceyrənin üç görünüşü. Kultura olunan fibroblast həllolan vəziyyətə gətirilmiş və sonra üç müxtəlif anticism preparatı ilə işlənilmişdir. Hər bir anticism spesifik olaraq bir tip filamenti əmələ gətirən zülal monomerlərə birləşir və fərqli rənglənmiş fluoressent boya (yaşıl, mavi və ya qırmızı) ilə kimyəvi əlaqəlidir. Rənglənmiş hüceyrələrin fluoressent mikroskopunda vizuallaşdırılması xüsusi boya-anticism preparatı ilə birləşmiş filamentlərin yerləşməsini aşkar edir. Bu halda, mikroborucuqlar mavi, mikrofilamentlər qırmızı və aralıq filamentlər yaşıl rənglənmişlər. Hər üç lif sistemləri hüceyrənin formasına və hüceyrə hərəkətinə kömək edir. [Nəzakətlə V. Small tərəfindən]

Torpaq və heyvan bağırsağı kimi çox geniş ətraf mühit şəraitində çoxalan *E. coli* kimi bakteriyalar təxminən eyni sayda zülalı kodlaşdıra 4000 qədər genə malikdir (bax Cədvəl 1-2). *Mycoplasma* növləri kimi parazit bakteriyalar amin turşularını və başqa qida maddələrini öz sahib orqanizmlərndən alırlar ona görə də onlar amin turşuları və bəzi lipidlərin sintezi üçün lazım olan genlərə malik deyillər. DNT, RNT, zülalların sintezi və membran funksiyası üçün lazım olan zülalları kodlaşdıran çox bakterial genlər bütün orqanizmlər üçün konservativ olaraq saxlanılmışdır və çox mühüm olan bu hüceyrə prosesləri haqqında bizim biliklərimizin çoxu ilk dəfə *E. coli* üzərində aşkar olunmuşdur. Məsələn, plazma membranından amin turşularının daşınmasını həyata keçirən, *E. coli* hüceyrəsinin müəyyən membran zülalları aminturşu ardıcıllığına, quruluşuna və funksiyasına görə məməlilərin beyin hüceyrələrində olan, **neyrotransmitterlər** (**neyroötürücülər**) adlanan, sinirdən-sinirə siqnalı ötürən kiçik molekullarla çox yaxındır (Fəsil 11 və 22).

E. coli-nin genlərinin və zülallarının çoxu, eləcə də onların funksiyası bütün orqanizmlərdə konservativ saxlanıldığından o alimlər tərəfindən ən sərfəli **model orqanizm** kimi seçilmişdir: sepesifik zülalların və genlərin funksiyasını öyrənmək üçün, və yaxud hüceyrə (orqanizmin) funksiyasınınn aspektlərini və ya onun tənzimlənməsini öyrənmək üçün bir sistemdir, başqa növlərdə də oxşar molekulların və proseslərin anlaşılmasını təmin edə bilir. Bütün bu fəsil boyu biz başqa model orqanizmlərlə də rastlaşacağıq, çünki onlar da yetişdirmək və tədqiq etmək üçün *E. coli* kimi asan olduğundan seçilmişlər. Təbii ki, çox bakteriyalar çox təhlükəli xəstəlikləri törədirlər və onların tədqiq olunması çox zaman diqqəti onların unikal bioloji xassələrinin anlaşılmasına, onları selektiv öldürən amma insanı və ya başqa sahib heyvan orqanizmini öldürməyən antibiotiklərin aşkar edilməsinə yönəldir.

1.3 Eukariot Hüceyrənin Quruluşu

Eukariotlar bütün bitki və heyvanlar aləminin, eləcə də göbələklər aləminin (maya göbələyi, çöl göbələkləri, kif göbələkləri), həmçinin yalnız bir-hüceyrəli göbələklərin və ameobanın daxil olduğu protozoanlar aləminin (*proto*, "primitiv" [sadə]; *soan*, "heyvanlar") bütün nümayəndələrini əhatə edir. Eukariot hüceyrələr ümumilikdə təxminən 10-100µm ölçüdə olur, ümumən bakteriyalardan çox böyük olurlar. İnsanın birləşdirici toxumasının hüceyrəsi olan tipik fibroblast hüceyrələr, təxminən 15 µm-dir həcmi və quru çəkisinə görə minlərlə dəfə *E. coli* hüceyrələrindən böyükdür. Birhüceyrəli protozoa (ibtidai) ameobanın hüceyrə diametri təxminən 0.5 mm-dir, fibroblast hüceyrəsindən 30 dəfədən artıq böyükdür.

Prokariot hüceyrələr kimi eukariot hüceyrələr də plazma membranı ilə örtülmüşdür. Amma, prokariot hüceyrələrdən fərqli olaraq eukariot hüceyrələrin əksəriyyəti (insanın qırmızı qan hüceyrələri istisna olmaqla) geniş daxili membranlara malikdir ki, bunlar da spesifik subhüceyrə kompartmentlərini, müxtəlif orqanoidləri əhatə edir, onları **sitoplazmadan** ayırırlar (Şıkil 1-12). Sitoplazmanın orqanoidsiz hissəsi olan sitozol suya, həll olan ionlara, kiçik molekullara və zülallara malikdir. Bitki hüceyrələri və əksər göbələk hüceyrələri onlara sərtlik və forma verən, həmçinin onların sürətli genişlənməsinə imkan verən hüceyrə divarı ilə əhatə olunmuşlar.

Çox eukariotlar çoxsaylı eyni orqanoidlərə və subhüceyrə quruluşlarına malikdirlər. Çox orqanoidlər vahid fosfolipid membranla əhatə olunmuşlar, amma nüvə mitoxondri və xloroplastlar iki membranla örtülüdürlər. Hər bir orqanoid membranı və orqanoid daxilindəki hər bir boşluq onların spesifik funksiyasını yerinə yetirməsinə imkan verən zülalların unikal dəstinə, o cümlədən lazım olan kimyəvi reaksiyaları kataliz edən fermentlərə malikdir Bu subhüceyrə kompartmentlərini (hissələrini) müəyyən edən membranlar onların daxili ion tərkibinə nəzarət edir, beləliklə də, o başqa orqanioidləri və sitozolu örtən membrandan əsaslı şəkildə fərqlənir. Biz burada bütün eukariotlar üçün ümumi olan orqanoidləri eləcə də yalnız müəyyən eukariot hüceyrə tiplərində tapılmış orqanoidləri təsvir edirik. Biz eukariot hüceyrələrə onların formasını verən və orqanoidlərin təşkilini həyata keçirən zülallarla başlayırıq.

Sitoskeletin Çoxsaylı Əhəmiyyətli Funksiyası Vardır

Sitoplazma ümumilikdə sitoskelet adlanan çoxsaylı lifli (fibrous) zülallar sırasına malikdir (bax Fəsil 17 və 18). Bunlar üç əsas

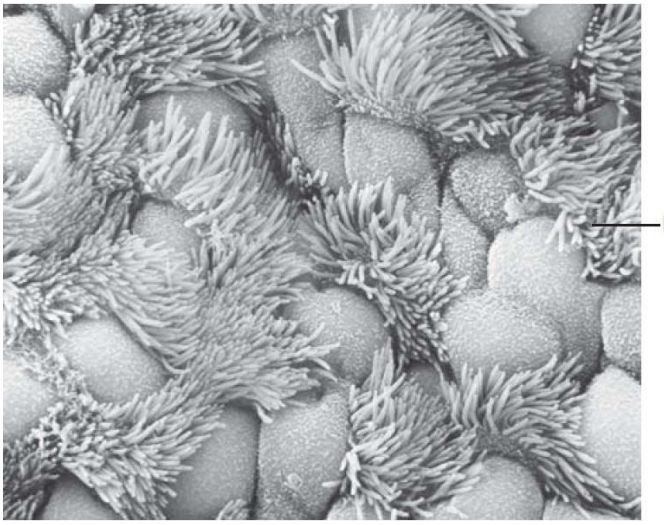
sinifdən təşkil olunublar: tubulin zülalların monomerlərindən qurulmuş mikroborucuqlar (20 nm diametrdə); aktin zülallardan qurulmuş mikrofilamentlər (7 nm diametrdə); aralıq filamentlər (10 nm diametrdə). Bütün bu liflər bir və ya daha artıq kiçik zülal subvahidlərdən qurulmuş uzun zəncirlərin çoxsaylı nüsxələridirlər (Şəkil 1-13). Sitoskelet hüceyrəyə güc və sərtlik verir və beləliklə ona formasını saxlamaqda kömək edir; bu neyronlarda daha çox aşkar görünür, burada mikroborucuqlar və başqa liflər hüceyrə bədənindən çıxan uzun nazik çıxıntıların – axonların və dentritlərin əmələ gəlməsinə (bax Şəkil 1-3e və Fəsil 22) və hər bir neyrona onun spesifik funksiyasını yerinə yetirməsinə imkan verirlər. Sitoskelet həmçinin hüceyrə daxilindəki quruluşların hərəkət etməsinə imkan verir, məsələn bəzi sitoskelet liflər orqanoidləri birləşdirir və ya orqanoid və xromosomların hərəkət edə biləcəyi istiqaməti və yolu əmələ gətirir. Başqa liflər hüceyrənin hərəkətliliyində aparıcı rol oynayırlar. Yəqin ki, əsas əhəmiyyətli olan, hüceyrənin bölünməsi və xromosomların və orqanoidlərin iki qız hüceyrə daxilinə seqreqasiyası sitoskelet və onunla əlaqədə olan zülalların təşkil etdiyi şəbəkə olmadan baş verə bilməzdi.

Kirpiciklər və qamçı plazma membranın oxşar çıxıntılarıdırlar. Onlar onlara forma verən və motor zülallarla birlikdə onların ritmik döyünməsinə imkan yaradan mikroborucuqlar bağına malikdirlər. Onlar materialları epiteli səthi boyunca hərəkət etdirirlər (Şəkil 1-14), spermanın üzməsinə və yumurtanı itələyərək yumurtalığa keçirməsinə imkan verirlər (bax Fəsil 18). Fəsil 16-da ətraflı qeyd olunduğu kimi, onurğalıların əksər hüceyrələri ən azı bir kirpiciyə malikdir ki, bu da hüceyrənin siqnal sistemində əhəmiyyətli rol oynayır.

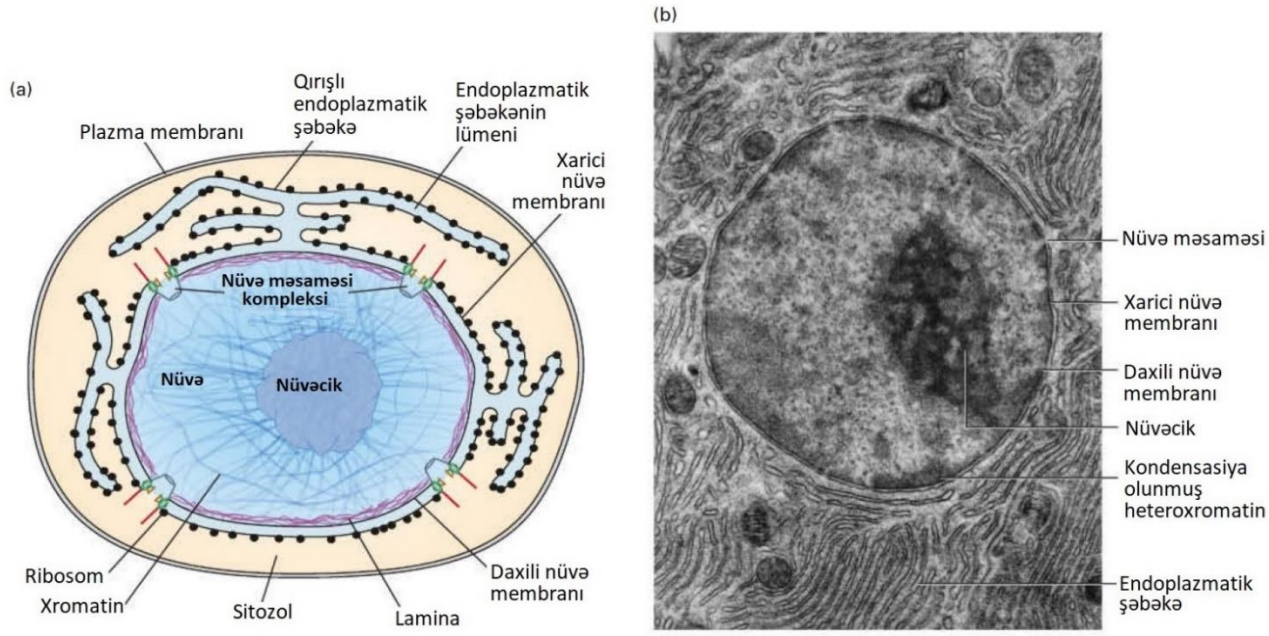
Nüvə DNT Genomuna, RNT Sintezi Aparatına və Fibroz Matrisaya Malikdir

Eukariot hüceyrələrin ən böyük orqanoidi olan **nüvə** iki membranla əhatə olunmuşdur, hər birinin fosfolipid ikiqatlısı müxtəlif tipli çoxsaylı zülallara malikdir (bax Şəkil 1-15). *Daxili nüvə membranı* nüvənin özünü müəyyənləşdirir. Əksər hüceyrələrdə *xarici nüvə membranı* endoplazmatik şəbəkənin davamıdır və daxili və xarici nüvə membranları arasındakı boşluq endoplazmatik şəbəkənin lümenlərinin davamıdır (bax Şəkil 1-15a). İki nüvə membranı spesifik membran zülallarından təşkil olunmuş, nüvə ilə sitzol arasında materialların daşındığı həlqə şəkilli quruluş olan **nüvə məsamələri kompleksində** qovuşurlar. Nüvə məsamələrinin quruluşu və materialların bunlar vasitəsilə tənzimlənən daşınması 10 və 13-cü fəsillərdə ətraflı verilmişdir. Laminlər adlanan aralıq filament zülalları daxili membranın daxili səthi boyunca **nüvə laminləri** adlanan iki-ölçülü şəbəkəni əmələ gətirir, ona forma və sərtlik verir. Laminlərin dağılması, Fəsil 19-da ətraflı verildiyi kimi, hüceyrə bölünməsinin erkən dövründə baş verir. Böyüyən və ya differensasiya edən hüceyrələrdə nüvə DNT replikasiyasının və ribosomal RNT-nin, mRNT-nin və geniş müxtəliflikdə kodlaşdırmayan RNT-lərin (bax Fəsil 5 və 9) sintez olunduğu sayt olduğundan metabolik cəhətdən fəal olur. Nüvə daxilində, çox hallarda **nüvəcik** adlanan daha sıx subkompartymenti görmək olur, burada ribosomal RNT-lər sintez olunur və toplanır (bax Şəkil 1-15b və Fəsil 10).

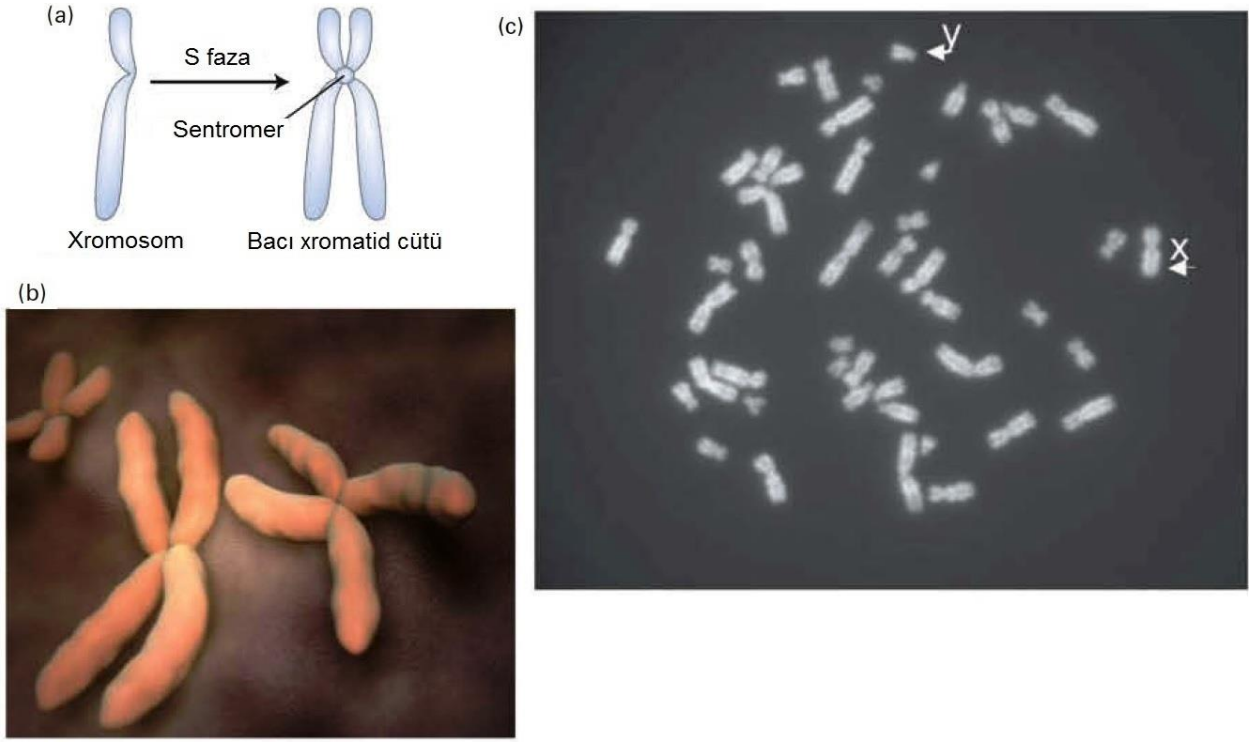
Orqanizmlərdə total DNT onun genomu hesab edilir. Prokariot hüceyrələrin əksəriyyətində genetik informasiyanın çoxu və ya hamısı təxminən bir millimetr uzunluqda olan tək bir dairəvi DNT molekulunda yerləşmişdir; bu molekul mikrometr ölçülü hüceyrənin mərkəzində çox sayda təkrar-təkrar öz-özünə qatlanaraq yerləşir (bax Şəkil 1-11). Əksinə, eukartiot hüceyrələrin nüvəsindəki DNT molekulları **xromosomlar** adlanan çoxsaylı uzun xətti quruluşlarda paylanmışdır. Xromosomların sayı və uzunluğu xüsusi bir növün bütün hüceyrələrində eynidir amma növlər arasında çox müxtəlifdir (bax Cədvəl 1-2). Hər bir xromosom çoxsaylı histonlar və başqa zülal molekulları ilə assosasiyada olan bir DNT molekulunu təşkil edir. Bölünməyən nüvələrdə xromosomlar səpələnmiş vəziyyətdədirlər və işıq mikroskopunda müşahidə etmək üçün çox sıx deyillər. Yalnız hüceyrənin bölünməsi zamanı fərdi xromosomlar işıq mikroskopu ilə görünə bilir. Bölünməyən hüceyrələrə elektron mikroskopu ilə baxılanda nüvənin *nukleoplazma* adlanan nüvəcik olmayan rayonları tünd- və açıq-rənglənmiş sahələr kimi görünə bilir. Tünd sahələr, çox zaman nüvə membranı ilə sıx assosasiyada olan rayonlar, **heteroxromatin** adlanan, RNT-yə transkripsiya oluna bilməyən qatılaşmış və sıxlaşmış DNT-yə malik olurlar (bax Şəkil 1-15b).



ŞƏKİL 1-14 Məməlilərin traxeyasını örtən kirpikli epitelinin səthi skan-edici elektron mikroskopu ilə çəkilmişdir. Əsas mikroborucuğa malik olan döyünən kirpicik seliyi və yad hissəcikləri tənəffüs traktindan (yolundan) kənara qovur, ağ ciyəri və hava yollarını təmiz saxlayır. [NIBSC/Science Source.]



ŞƏKİL 1-15 Nüvənin quruluşu. (a) Tipik hüceyrə nüvəsinin quruluşunun və xarici nüvə membranının qırışlı endoplazmatik şəbəkə ilə birləşməsinin sxematik diaqramı. Qırışlı endoplazmatik şəbəkənin membranına yapışmış kiçik qara nöqtələr membran və ifraz olunan zülalları sintez edən ribosomlardır. (b) Yarasanın, *Myotis lucifugus*, mədəaltə vəzinin asinar hüceyrəsinin elektron mikrofotosu. Nüvəcik nüvənin subkompartmentidir və membranla əhatə olunmur, ribosomal RNT-lərin çoxu nüvəcikdə sintez olunur. Nüvədə tünd rənglənmiş sahələr heteroxromatin sahələridir. [(b) hissəsi Don W. Fawcett/Science Source.]



ŞƏKİL 1-16 Fərdi xromosomlar hüceyrə bölünməsi (mitoz) zamanı görünə bilirlər. (a) Hüceyrə tsiklinin S fazasında (bax Şəkil 1-16) xromosomlar ikiləşir və hər biri tam DNT kompleksinə malik olan qız "bacı xromosomlar" sentromerlərində birləmiş olurlar. (b) Əsil hüceyrə bölünməsi prosesi zamanı xrmosom DNT-si yüksək sıxılmış yığcam vəziyyətə keçir və qız xromatidlərin cütü, burada təsvir edildiyi kimi elektron mikroskopunda görünə bilir. (c) Mitozun metafaza mərhələsində, mikroborucuqları-depolimerzasiya edən kolsemid ilə təsir etməklə insanın kişi fərdinin arrest olunmuş limfoid kultura hüceyrələrində xromosom səpilməsinin işıq mikroskopunda çəkilmiş şəkili. İkiləşmiş X və Y xromosomların hər birinin bir nüsxəsi və başqalarının isə iki nüsxəsəsi vardır. [(b) hissəsi Medical RF/The medical File/Peter Arnold İnc. (c) hissəsi hörmətlə Tatyana Pintikovadan.]

Əsas boyalarla intensiv boyanan xromosomlar yalnız hüceyrə bölünməsi zamanı, DNT möhkəm sıxlaşdığı şəkildə işıq və elektron mikroskoplarında görünə bilirlər (Şəkil 1-16). Baxmayaraq ki, böyük genom DNT molekulu prokariotlarda zülallarla assosasiyadadır, bakterial xromosom daxilində DNT-nin yerləşməsi, onun eukariot hüceyrələrdəki xətti xromosolar daxilindəki yerləşməsindən güclü surətdə fərqlənir; bakterial xromosomlar eukariot xromosomlardan fərqli olaraq dairəvidirlər və daha çox müxtəlif tipli zülallarla assosasiyada olurlar.

Eukariot Hüceyrələr Böyük Sayda Daxili Membran Quruluşlarına Malikdirlər

Biz əvvəldə qeyd etdik ki, prokariot hüceyrələrdən fərqli olaraq, əksər eukariot hüceyrələr orqanoidlər adlanan spesifik subhüceyrə kompartmentini əhatə edən geniş daxili membranlara malikdirlər. Biz burada orqanoidləri və onların funksiyasını nəzərdən keçiririk.

Endoplazmatik Şəbəkə və Qolci Kompleksi Ümumiyyətlə bütün eukariotik hüceyrələrdə ən böyük membran endoplazmatik şəbəkə (ER) adlanan orqanoidi – qapalı, yastılaşmış, **sisternalar** adlanan membrana-bağlı kisələrin geniş şəbəkəsini əhatə edir (Şəkil 1-17; həmçinin bax Şəkil 1-15a). Endoplazmatik şəbəkənin hüceyrədə çox funksiyası var, amma o lipidlərin, ifraz olunan zülalların və membran zülallarının çox tipinin sintezi üçün xüsusi əhəmiyyət kəsb edir. **Hamar endoplazmatik şəbəkə** ona görə hamardır ki, onun ribosomları yoxdur, o yağ turşularının və fosfolipidlərin sintez olunduğu sahədir.

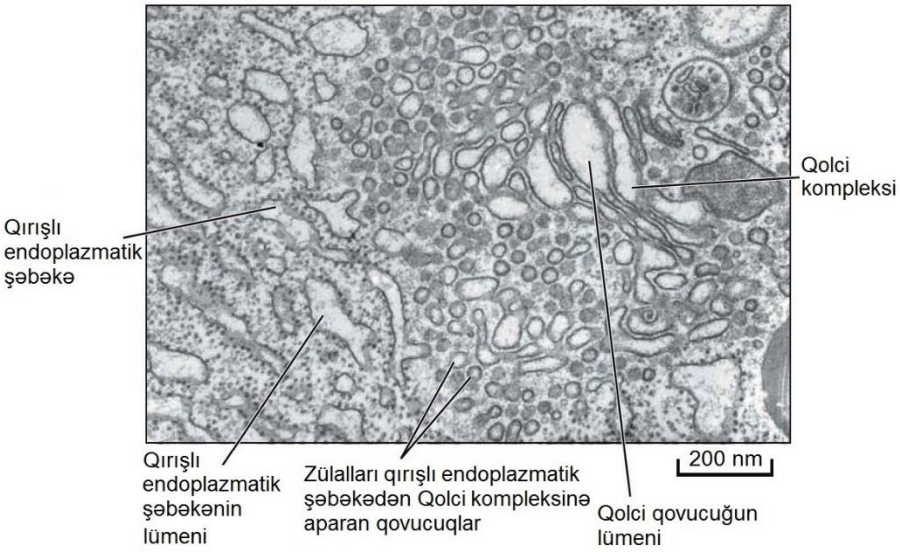
Əksinə, **qırışlı endoplazmatik şəbəkənin** sitozol tərəfinə ribosomlar düzülmüşdür, bu ribosomlar müəyyən membran və orqanoid zülallarını və virtual olaraq hüceyrədən ifraz olunan bütün zülalları sintez edir (bax Fəsil 13). Böyüyən polipeptid ribosomdan çıxan kimi, o membrana batmış xüsusi nəqliyyat zülallarının köməyi ilə qırışlı ER membranından keçir. Yeni əmələ gəlmiş membran zülalları qırışlı ER membranı ilə birləşmiş vəziyyətdə qalır, ifraz olunmalə zülallar isə lümendə, orqanoidin sulu daxilində toplanır. Zülallar qırışlı ER-də sintez olunduqdan bir neçə dəqiqə sonra onların əksər hissəsi membranla əhətə olunmuş kiçik nəqliyyat qovucuqları daxilində orqanoidi tərk edirlər. Qırışlı ER membranın müəyyən rayonlarından tumurcuqlayıb əmələ gələn bu qovucuqlar ribosomlarla örtülməmişdir, zülalları başqa membranla-əhatə olunan orqanoidə, Qolci kompleksinə aparırlar (bax Şəkil 1-17). Fəsil 14-də ətraflı verildiyi kimi, ifraz olunan zülallar və membran zülalları, Qolci kompleksində onların normal fəaliyyət göstərməsi üçün əhəmiyyətli olan bir sıra fermentlə-kataliz olunan kimyəvi modifikasiyalara məruz qalırlar.

İfraz olunan və membran zülaları Qolci kompleksində modifikasiya olunduqdan sonra, onlar Qolci kompleksin bir tərəfindən tumurcuqlayıb ayrılan ikinci qovucuqlar dəsti vasitəsi ilə kompleksdən xaricə daşınır. Bəzi qovucuqlar plazma membranı təyinatlı zülalları və ya hüceyrədən hüceyrəxarici boşluğa ifraz olunası həllolan zülalları daşıyırlar, digərləri isə həll olan və ya membran zülallarını lizosomlara və ya başqa orqanoidlərə daşıyırlar. Hüceyrədaxili nəqliyyat qovucuqlarının hansı membrana qovuşmalı olmasını və öz tərkib hissəsini hara çatdırmaq lazim olduğunu "bilməsi" Fəsil 14-də müzakirə olunur.

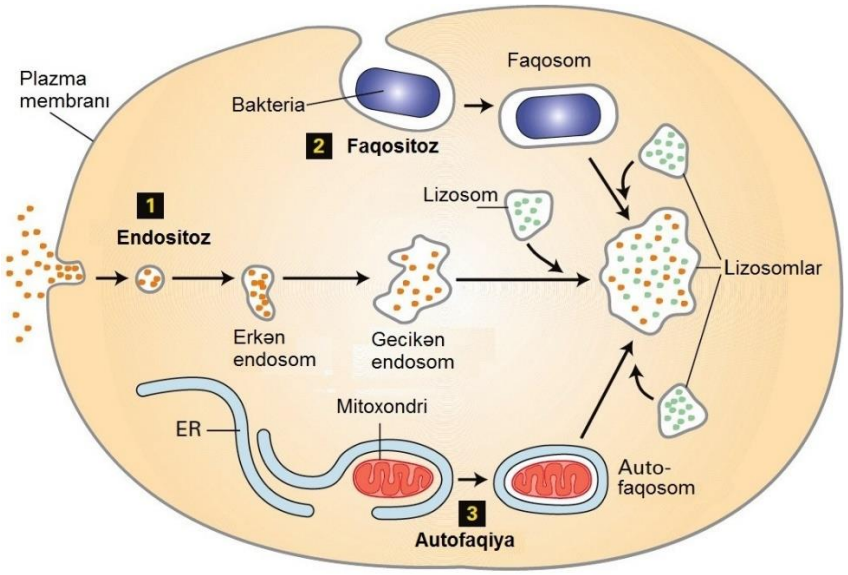
Endosomlar Baxmayaraq ki, nəqliyyat zülalları plazma membranında ionların və kiçik molekulların lipid ikiqatlısından keçərək hüceyrə daxilinə hərəkətini həyata keçirirlər, zülalar və hüceyrəxarici mühitdə olan başqa həllolan makromolekullar endositoz yolu ilə hüceyrə daxilinə mənimsənilir. Bu prosedə, plazma membranının bir seqmenti invaqinasiya edərək örtülü bir çuxuru əmələ gətirir, onun sitozol tərəfi qovucuğun əmələ gəlməsinə səbəb olan xüsusi zülallar dəsti ilə örtülü olur. Çüxur membranla əhatə olunmuş və daxilində hüceyrəxarici material olan qovucuq kimi membrandan qoparaq sitoplazmaya düşür. Bu qovucuqlar **endosoma**, membranla-məhdudlaşan borucuqlar və qovucuqların çeşidləmə stansiyasına çatdırılaraq ona qovuşur (bax Şəkil 1-18). Bu kompartmentdən bəzi membran zülalları yenidən istifadə üçün geriyə, plazma membranina göndərilir, başq membran zülalları sonda dağlmaq üçün qovucuqlarla daşınaraq lizosomlara qovuşurlar. Tam endosit yolu Fəsil 14-də ətraflı təsvir olunur.

Lizosomlar Lizosomlar hüceyrədaxili membranların qapalı kompartmenti əmələ gətirmək qabliyyətinin çox gözəl nümunəsidir, və bu kompartmentin lümeninin tərkibi (kompartmentin sulu daxili) onu əhatə edən sitozolun tərkibindən əhəmiyyətli dərəcədə fərqlənir. Yalnız heyvan hüceyrələrində tapılmış lizosom hüceyrə və ya orqanizm üçün yararsız hala düşmüş köhnəlmiş çox kompartmentlərin dağıdılmasını həyata keçirir. Yaşlı orqanoidlərin lizosomlarda dağıldığı proses **avtofaqiya** ("öz-özünü yemək") adlanır. Endositoz və ya faqositoz yolu ilə hüceyrə daxilinə götürülmüş materiallar lizosomlarda parçalana da bilər (bax Şəkil 1-18). **Faqositoz** zamanı böyük, həllolmayan hissəciklər (məsələn, bakteriya) plazma membranı ilə əhatə olunur və daxilə mənimsənilir.

Lizosomlar polimerləri monomer subvahidlərinə parçalayan fermentlər qrupuna malikdirlər. Məsələn, nukleazalar RNT və DNT-ni onların quruluş blokları olan mononukleotidlərə parçalayır, fosfatazalar mononukleotidlərdən, fosfolipidlərdən və başqa birləşmələrdən fosfat qrupunu çıxarıb uzaqlaşdırır, daha başqa fermentlər mürəkkəb polisaxaridləri və qlikolipidləri kiçik vahidlərinə qədər parçalayır. Ümumilikdə *turş hidrolazalar* kimi adlandırılan bütün bu lizosomal zülallar turş pH mühitində daha effektli işləyir. Turş pH zülalların denaturasiyasına kömək edir onları lizosomal hidrolazaların təsir etməsi üçün mükün edir. Bu fermentlər hüceyrələrin neytral pH-da və əksər hüceyrəxarici mühitdə çox az fəal olurlar. Beləliklə, əgər lizosom öz fermentlərini pH mühiti 7.2 – 7.3 olan sitozola buraxırsa onlar sitozol komponentlərinin çox az parçalanmasına səbəb ola bilirlər. Sitozol və nüvə zülalları əsasən lizosomlarda parçalanmırlar, əksinə sitozolun daha böyük çoxzülallı kompleksi proteasomlarda parçalanırlar (bax Fəsil 3).



ŞƏKİL 1-17 Qolci kompleksi və qırışlı endoplazmatik şəbəkə. İnsanın qaraciyər hüceyrələrinin kəsiyinin elektron mikrofotosu zəngin ribosom-səpilmiş qırışlı endoplazmatik şəbəkəni və Qolci kompleksi, eləcə də sitozolda olan çoxsaylı sərbəst ribosomları göstərir. [Nəzakətlə George E. Palade EM Slide Collection, University of California, San Diego.]



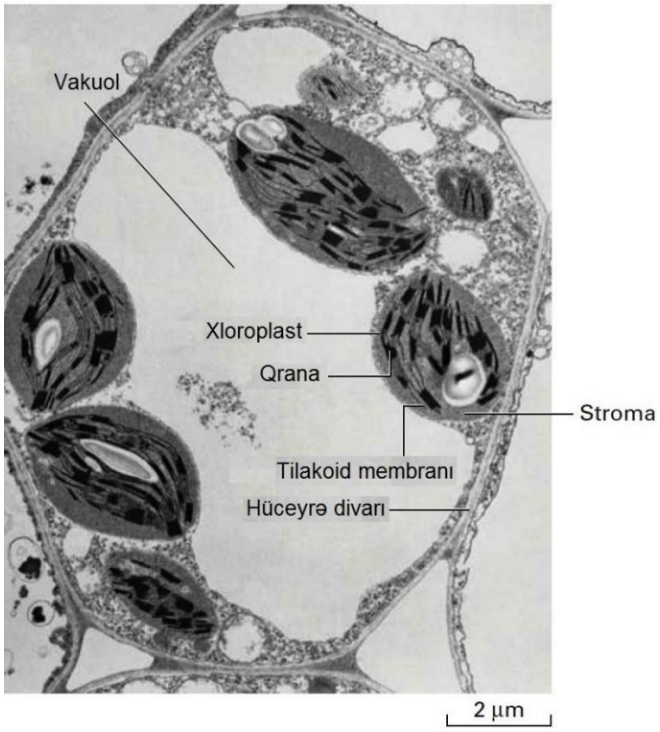
ŞƏKIL 1-18 Endosomlar və başqa hüceyrə quruluşları materialları lizosomlara çatdırırlar. Materialların lizosomlara hərəkət etdiyi üç yolun sxematik görünüşü. Həllolan makromolekullar və hüceyrə səthində zülallara birləşmiş molekullar plazma membranı seqmentinin invaqinasiyası yolu ilə hüceyrə daxilinə keçirilir və endositoz yolu ilə (1) lizosomlara çatdırılır. Bütöv hüceyrələr və başqa böyük, həllolmayan hissəciklər hüceyrə səthindən faqositoz yolu ilə (2) lizosomlara doğru hərəkət edirlər. İşlənilib-köhnəlmiş orqanoidlər və kütləvi şəkildə sitoplazma avtofaq yolu ilə (3) lizosomlara çatdırılır. Lizosomun turş lümeni daxilində hidrolitik fermentlər zülalları, nuklein turşularını, lipidləri və başqa böyük molekulları parçalayır.

Peroksisomlar Bütün heyvan hüceyrələri (eritrositlərdən başqa) və çox bitki və göbələk hüceyrələri təxminən kürə şəkilli, 0.2-1.0 µm diametrli orqanoidlərə **peroksisomlara** malikdirlər. Peroksisomlarda molekulyar oksigendən istifadə edərək üzvi maddələri oksidləşdirən və prosesdə aşındırıcı maddə hidrogen-peroksidi (H_2O_2) əmələ gətirən fermentlər olan bir sıra oksidazalar var. Peroksisomlar həmçinin çoxlu miqdarda, hidrogenperoksidi parçalayaraq suyu və oksigeni əmələ gətirən *katalaza* fermentinə malikdir (bax Fəsil 12). Bitki toxumlarında ehtiyat saxlanılan lipidləri böyümək üçün karbon və enerji mənbəyi kimi oksidləşdirən kiçik orqanoid *qlioksisomlar* olur. Onlar peroksisomlara oxşardırlar və çoxsaylı eyni fermentlərə, həmçinin əlavə olaraq yağ turşusunu qlükoza sələflərinə çevirən fermentlərə malikdirlər.

Bitki Vakuolu Əksər bitki hüceyrələrində ən azı bir membranla məhdudlaşan və suyu, ionları, həmçinin şəkərlər və amin turşuları kimi kiçik-molekullu qida maddələrini özündə ehtiyat saxlayan **vakuol** vardır. Vakuol membranında müxtəlif membran zülalları bu molekulların sitozoldan daşınmasına və vakuol lümenlərində saxlanılmasına imkan verir. Vakuolların sayı və ölçüsü həm hüceyrənin tipindən həm də inkişaf mərhələsindən asılıdır; tək bir vakuol yetkin bitki hüceyrələrinin 80 faizə qədər böyük bir hissəsini zəbt edə bilir (Şəkil 1-19). Lizosomlarda olduğu kimi, vakuolun lümeni parçalanma fermentlərinin dəstinə və turş pH mühitə malikdir, bu da vakuol membranındakı oxşar nəqliyyat zülalları vasitəsi ilə saxlanılır. Beləliklə bitki vakuolları heyvan hüceyrələrində olan lizosomlar kimi parçalama funksiyalarına da malik ola bilir. Oxşar ehtiyat saxlama vakuolları yaşıl yosunlarda və göbələklər kimi çox mikroorqanizmlərdə də tapılmışdır.

Mitoxondri Aerob Hüceyrələrdə ATP İstehsalının Əsas Saytıdır

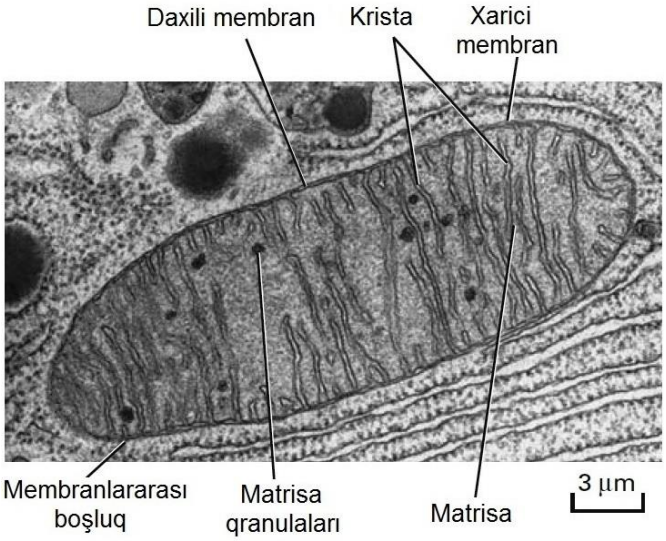
Əksər eukariot hüceyrələr çox sayda mitoxondrilərə malik olur (Şəkil 1-20) və bunlar hüceyrənin həcminin 25 faizə qədərini tutur. Bu mürəkkəb orqanoidlər, aerob metabolizm zamanı ATP istehsal edilən sayt, ölçüsünə görə yalnız nüvədən, vakuollardan və xloroplastlardan geri qalır. Mitoxondrini əhatə edən iki membran tərkibinə və funksiyasına görə fərqlənirlər. **Xarici mitoxondri membran**ında çox molekulların sitozoldan daxili və xarici membran arasında olan **membranlararası** boşluğa keçməsinə imkan verən zülallar yerləşir. **Daxili mitoxondri membranı** daha az keçiricidir, təxminən 20 faiz lipiddən və 80 faiz zülallardan ibarətdir, zülalların payı başqa hüceyrə membranlarına nisbətən yüksəkdir. Daxili membranın səth sahəsi matrisaya və ya mərkəzi sulu maye hissəyə tərəf çıxan böyük sayda qatlanmalar və ya kristalar hesabına güclü şəkildə artır.



ŞƏKİL 1-19 Yarpaq hüceyrələrinin nazik kəsiyinin elektron mikrofotosu. Bu hüceyrələrdə tək böyük vakuol hüceyrənin həcminin çox hissəsini zəbt edir. Beş xloroplastın hissələri və hüceyrə divarı da görünür. Xloroplastların daxili subkompartmentlərinə də diqqət edin. [Biophoto Associates/Science Source.]

Fotosintez etməyən hüceyrələrdə, ATP sintezinin əsas mənbəyi yağ turşuları və qlükozadır. 1 molekul qlükozanın karbon iki oksidə və suya qədər mürəkkəb aerob parçalanması 30 molekula qədər ATP-nin ADP və qeyri üzvi fosfatdan sintezi ilə müşayət olunur (bax Şəkil 1-6). Eukariot hüceyrələrdə qlükoza parçalanmasının ilkin mərhələsi sitozolda baş verir, hər bir qlükoza molekulunun parçalanması zamanı iki ATP molekulu əmələ gəlir. Oksidləşmənin və ATP sintezinin son mərhələləri mitoxondri matrisasında və daxili membranda olan fermentlər tərəfindən aparılır (bax Fəsil 12). Mitoxondridə hər bir qlükoza molekulundan 28 molekula qədər böyük miqdarda ATP əmələ gəlir. Eynilə, yağ turşularının karbon iki oksidə qədər oksidləşməsi zamanı sintez olunan bütün ATP molekulları virtual olaraq mitoxondridə baş verir. Ona görə də mitoxondrilər hüceyrənin "enerji zavodları" hesab edilə bilər.

Mitoxondri az miqdarda mitoxondrial zülalları kodlaşdıran kiçik DNT-yə malikdir, mitoxondrial zülalların çoxu nüvə DNT-sində kodlaşdırılır. Fəsil 12-də müzakirə olunduğu kimi, populyar olan endosimbiont nəzəriyyəsi irəli sürür ki, mitoxondri mənşəyinə görə qədim bakteriyaların eukariot hüceyrələrin əcdadlarının endositozu nəticəsində meydana gəlmişdir. Bakterial plazma membran inkişaf edərək mitoxondrinin daxili membranına çevrilmişdir.



ŞƏKİL 1-20 Mədəaltı vəz hüceyrələrində mitoxondrinin elektron mikrofotosu. Hamar xarici membran mitoxondrinin xarici sərhədlərini əmələ gətirir. Daxili membran xarici membrandan fərqlidir və yüksək dərəcədə invaqinasiya edərək sistalar adlanan vəraqləri və borucuqları əmələ gətirir. Kristalardakı membrana batmış zülallar tərəfindən ATP istehsal olunur. Daxili və xarici membranlar arasındakı sulu boşluq (membranlararası boşluq) və daxili membrandan içəridəki boşluq (matrisa) hər ikisi şəkərlərin, lipidlərin və başqa molekulların metabolizmi üçün əhəmiyyətli olan xüsusi zülallara malikdirlər. [Keith R. Porter/Science Source.]

Xloroplastlar Fotosintezin Baş Verdiyi Daxili Kompartmenti Əmələ Gətirir

Vakuollar istisna olmaqla, xloroplastlar bitki və yaşıl yosun hüceyrələrində ən böyük və xarakterik orqanoidlərdirlər (bax Şəkil 1-19). Endosimbiont nəzəriyyəsi (bax Fəsil 12), təsdiq edir ki, bu orqanoidlər primitiv fotosintezedici bakteriyaların endositozu ilə meydana gəlmişdir. Xloroplastlar 10 µm qədər böyük uzunluqda və adətən 0.5-2 µm qədər qalınlıqda ola bilirlər, amma onlar formasına və ölçüsünə görə müxtəlif hüceyrələr, xüsusən də yosunlar arasında fərqlənirlər. Xloroplastları əhatə edən xarici və daxili membranlardan başqa orqanoid həm də yastılaşaraq disklər əmələ gətirən, **tilakoidlər** adlanan membranla məhdudlaşmış qovucuqların geniş daxili sisteminə malikdir. Tilakoidlər çox zaman *qranalar* adlanan qalaqları əmələ gətirirlər və *stroma* adlanan sulu maye matrisa daxilində yerləşirlər. Tilakoid membranlar yaşıl piqmentlərə (xlorofillərə) və işığı udan başqa piqmentlərə, həmçinin fotosintezin gedişi

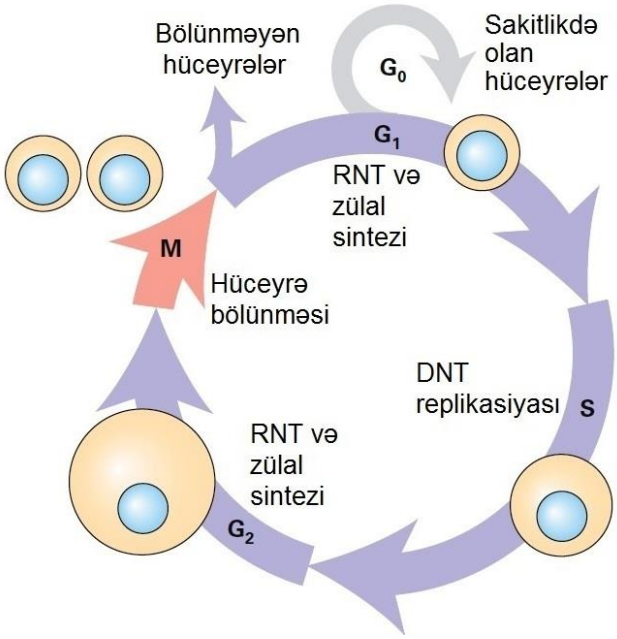
zamanı ATP yaradan fermentlərə malikdirlər. ATP-nin bir hissəsi karbon iki oksidin stromada yerləşən fermentlərlə üç karbonlu aralıq məhsula çevrilməsində istifadə olunur, sonra aralıq məhsullar (intermediatlar) sitozola eksport olunur və şəkərlərə çevrilirlər.

Mitoxondri və xloroplastlarda ATP-in əmələ gəldiyi molekulyar mexanizmlər Fəsil 12-də təsvir edildiyi kimi çox oxşardırlar. Bundan başqa iki membranla əhatə olunmaqla xloroplastların və mitoxondrilərin başqa ümumi xüsusiyyətləri də vardır: hər ikisi hüceyrə daxilində bir yerdən başqa yerə miqrasiya edir və hər ikisinin bəzi əsas orqanoid zülallarını kodlaşdıran öz DNT-si vardır (bax Fəsil 12). Mitoxondrial və xloroplast DNT ilə kodlaşdırılan zülallar orqanoid daxilindəki ribosomlarda sintez olunurlar. Amma, hər iki orqanoiddə zülalların əksəriyyəti nüvə DNT-də kodlaşdırılır və sitozolda sintez olunur, sonra bu zülallar Fəsil 13-də təsvir olunan proseslə orqanoid daxilinə keçir.

Bütün Eukariot Hüceyrələr Bölünmələrini Tənzimləmək Üçün Oxşar Tsikldan İstifadə Edirlər

Birhüceyrəli eukariotlar, heyvanlar və bitkilər əhəmiyyətli dərəcədə eyni olan, hüceyrəni bölünməyə hazırlayan serial proseslərdən ibarət olan **hüceyrə tsiklindən** istifadə edirlər və əsil bölünmə prosesi **mitoz** adlanır. Ümumiyyətlə eukariotik hüceyrə tsikli dörd fazaya bölünür (Şəkil 1-21). Xromosomlar və onların daşıdığı DNT **S (sintez) fazasında** ikiləşirlər (replikasiya olunurlar). İkiləşmiş xromosomlar M (mitoz) fazası dövründə ayrılırlar, hər bir qız hüceyrə hər bir xromosomun bir sürətini alır. M və S fazalar bir-birindən aralıq mərhələlərlə, **G_1 faza** və **G_2 faza** ilə ayrılırlar,bu fazalar müddətində RNT və zülallar istehsal olunur və uyğun olaraq hüceyrənin ölçüsü böyüyür.

Optimal şəraitdə, *E. coli* kimi bəzi bakteriyalar hər 30 dəqiqədən bir bölünərək yeni qız hüceyrələrini yaratmaq qabliyyətinə malikdirlər. Eukariot hüceyrələrin əksəriyyətinin böyüməsi və bölünməsi kifayət qədər uzun zaman götürür, əsasən bir neçə saat. Üstəlik, eukariotların hüceyrə tsikli normal halda yüksək dərəcədə tənzimlənir (Fəsil 19). Əgər əhəmiyyətli qida maddələri və müəyyən hormonal siqnallar çatışmazsa bu cürə sıx nəzarət olunma, hüceyrələrin və toxumaların tarazlaşdırılmamış, hədsiz dərəcədə artmasına mane olur. Yetkin heyvanlarda sinir hüceyrələri və eninəzolaqlı əzələ hüceyrələri kimi bəzi yüksək dərəcədə ixtisaslaşmış hüceyrələr çox nadir hallarda bölünürlər. Amma, orqanizm işlənib köhnəlmiş hüceyrələri yenisi ilə əvəz edir və ya yaralanmalar və məşqlər zamanı əzələ toxumasının böyüməsində differensasiya etməmiş sütun hüceyrələrdən yeni əzələ hüceyrələrinin yaranmasında olduğu kimi, yeni tələbat üçün əlavə hüceyrələr istehsal edir. Başqa bir nümunə kimi, insanın yuksək dağlara qalxması zaman daha çox oksigen almaq üçün tələb olunan əlavə qırmızı qan hüceyrələrini yaratmsını göstərmək olar. Xərçəng xəstəliyinin fundamental çatışmazlığı hüceyrənin bölünməsinə və çoxalmasına olan nəzarətin itirilməsidir. Fəsil 24-də biz, qeyri müvafiq, nəzarət olunmayan hüceyrə proliferasiyasına aparan molekulyar və hüceyrə hadisələrini oyrənirik.



ŞƏKİL 1-21 Çoxalma zamanı bütün eukariotk hüceyrələr fasiləsiz şəkildə inkişaf edərək hüceyrə tsiklinin dörd mərhələsindən keçməklə yeni qız hüceyrələrini yaradırlar. Proliferasiya edən insan hüceyrələrində hüceyrə tsiklinin dörd fazası, hüceyrə tipindən və inkişaf səviyyəsindən asılı olaraq 10-20 saat müddətində ardıcıl davam edir. Hüceyrə G_1, S və G_2 fazalarından ibarət olan interfazanın gedişində öz kütləsini təxminən iki dəfə artırır. S fazası dövründə DNT-nin replikasiyası hüceyrənin hər xromosomunun dörd nüxsəsini yaradır. Mitoz (M) fazasında xromosomlar bərabər şəkildə qız hüceyrələrə bölünürlər və sitoplazmada çox hallarda təxminən bərabər yarıya bölünür. Müəyyən şərait daxilində, məsələn aclıq zamanı və ya toxumalar özlərinin maksimal ölçüsünə çatanda hüceyrələr hüceyrə tsiklini dayandırırlar və G_0 adlandırılan gözləmə vəziyyətində qalırlar. G_0-da olan hüceyrələrin çoxu şəraitin dəyişilməsindən asılı olaraq yenidən hüceyrə tsiklinə daxil ola bilirlər.

1.4 Birhüceyrəli Eukariotik Model Orqanizmlər

Hüceyrənin molekulyar funksiyası barədə bizim müasir anlayışlarımız əsasən, model orqanizmlər kimi adlandırılan bir neçə tip orqanizmlər üzərindəki tədqiqatlara əsaslanıb (Şəkil 1-22). Genlərin, zülalların, orqanoidlərin, hüceyrə tiplərinin və sair təkamül prosesində qorunub saxlanmasına əsasən bioloji funksiyaların və quruluşların kəşf olunması çox hallarda bir orqanizm üzərində baş verir və digərlərinə tətbiq edilir. Beləliklə, tədqiqatçılar bilərək ki, bir orqanizmdə əldə edilən nəticələr digərlərində geniş tətbiq oluna bilər, tədqiqatları əsasən qoyulmuş suallara daha tez və tam cavab verə bilən ən uyğun orqanizmlə həyata keçirirlər. Həqiqətən də, çox orqanizmlər, xüsusən də siçovullar, qurbağalar, dəniz kirpiləri, toyuqlar və kif göbələkləri hüceyrə biologiyası tədqiqatlarında son dərəcə əhəmiyyətli orqanizmlər olmuşlar və olaraq da davam edirlər. Getdikcə daha çox orqanizmlərin tam genomu oxunduqca, böyük müxtəliflikdə olan başqa növlərin orqanizmləri tədqiqatı üçün, xüsusən də genlərin, hüceyrələrin və orqanizmlərin təkamülünün öyrənilməsində və bu orqanizmlərin geniş müxtəliflikdə ekoloji nişaya necə uyğunlaşması, adaptasiya olunmasının öyrənilməsində istifadə edilməsi artır.

Artıq gördüyümüz kimi, bakteriyalar bir sıra hüceyrə funksiyalarının öyrənilməsi üçün çox gözəl modeldirlər, amma onlarda eukariotlarda tapılan orqanoidlər yoxdur. Maya göbələyi kimi birhüceyrəli eukariotlar eukariotik hüceyrənin quruluşunun və funksiyasının çoxsaylı fundamental aspektlərini öyrənmək üçün istifadə olunur. Həlqəvi qurdlar, meyvə milçəyi və siçanlar kimi **metazoan** modelləri daha mürəkkəb toxuma və orqan sistemlərini və inkişaf proseslərini öyrənmək üçün tələb olunan modeldirlər. Bu bölmədə və növbəti bölmədə bizim görəcəyimiz kimi, bir sıra eukariotik model orqanizmlər belə mürəkkəb hüceyrə sistemlərinin və mexanizmlərinin başa düşülməsi üçün daha geniş istifadə olunurlar.

Maya Hüceyrələri Eukariotik Hüceyrələrin Funksiyalarının və Quruluşlarının Fundamental Aspektlərinin Öyrənilməsində İstifadə Olunurlar

Birhüceyrəli eukariotların bir qrupu, maya göbələkləri, eukariotik hüceyrələrin formalaşmasının və funksiyasının molekulyar-genetik analizlərində olduqca faydalı olduğu sübut edilmişdir. Ümumilikdə göbələklərə aid edilən maya və onların çoxhüceyrəli qohumları kif göbələkləri, heyvan və bitki qalıqlarının yenidən istifadə olunması üçün parçalamaqla çox əhəmiyyətli ekoloji rolu oynayırlar. Onlar həmçinin çoxsaylı antibiotikləri istehsal edir və çörək bişirmə, pivə və şərab sənayesində istifadə olunurlar.

Çörək bişirilməsində və pivə istehsalında istifadə olunan maya *Saccharomyces cerevisiae* bu kitabda tez-tez rast gəlinəcək, çünki o çox əhəmiyyətli eksperimental orqanizm kimi tanınmışdır. *S. cerevisiae*-də ekspressiya olunan təxminən 6000 yaxın müxtəlif zülalın (Cədvəl 1-2) çoxsaylı homoloqları eukariotların əksəriyyətində bəlkə də hamısında tapılmışdır və hüceyrə bölünməsi üçün və ya fərdi eukariotik orqanoidlərin fəaliyyəti üçün əhəmiyyətlidir. Zülal ifrazını təşviq edən endoplazmatik şəbəkə və Qolci aparatında zülallar haqqında bizim bildiklərimizin əksəriyyəti ilk dəfə mayada öyrənilmişdir (bax Fəsil 14). Maya həmçinin hüceyrə tsiklinin tənzimlənməsində iştirak edən və DNT-nin replikasiyasında və transkripsiyada iştirak edən çoxlu miqdarda zülalların identifikasiyasında əhəmiyyətlidir. *S. cerevisiae* (Şəkil 1-23a; həmçinin bax Şəkil 1-22a) və bəzi başqa maya göbələkləri molekulyar və hüceyrə bioloqlarına çoxsaylı imkanları təklif edir.

● Çox böyük miqdarda maya hüceyrələri asanlıqla və az xərclə kultura formasında tək bir hüceyrədən çoxala bilir; belə hüceyrə klonunda onların hamısı eyni genlərə və eyni biokimyəvi xüsusiyyətlərə malik olur. Fərdi zülalları və çoxzülallı kompleksləri hüceyrələrdən çox böyük miqdarda ayırmaq və sonra da ətraflı öyrənmək olur.

● Maya hüceyrələri həm haploid şəkilində (hər xromosomun bir nüsxəsinə malik olan) həm də diploid şəkildə (hər xromosomun iki nüsxəsinə malik olan) şəkildə mitozla çoxala bilirlər; bu, əhəmiyyətli hüceyrə zülallarını kodlaşdıran genlərdə mutasuyaları daha asanlıqla ayırmaq və xarakterizə etməyə imkan verir.

● Çoxsaylı başqa orqanizmlər kimi maya göbələyi də hüceyrələr arasında gen mübadiləsinə imkan verən cinsi tsiklə malikdir. Qida qıtlığı şəraitində diploid hüceyrələrdə, iki tip haploid qız hüceyrələrini, **a** və **α** hüceyrələrini formalaşdırmaq üçün xüsusi hüceyrə bölünməsi tipi olan meyoz bölünmə baş verir. Haploid hüceyrələr mitoz yolu ilə də artır. Əgər haploid **a** və **α** hüceyrələr qarşılaşarsa onlar qovuşaraq hər xromosomun iki nüsxəsinə malik olan **a**/**α** diploid hüceyrəni yarada bilərlər (Şəkil 1-23b).

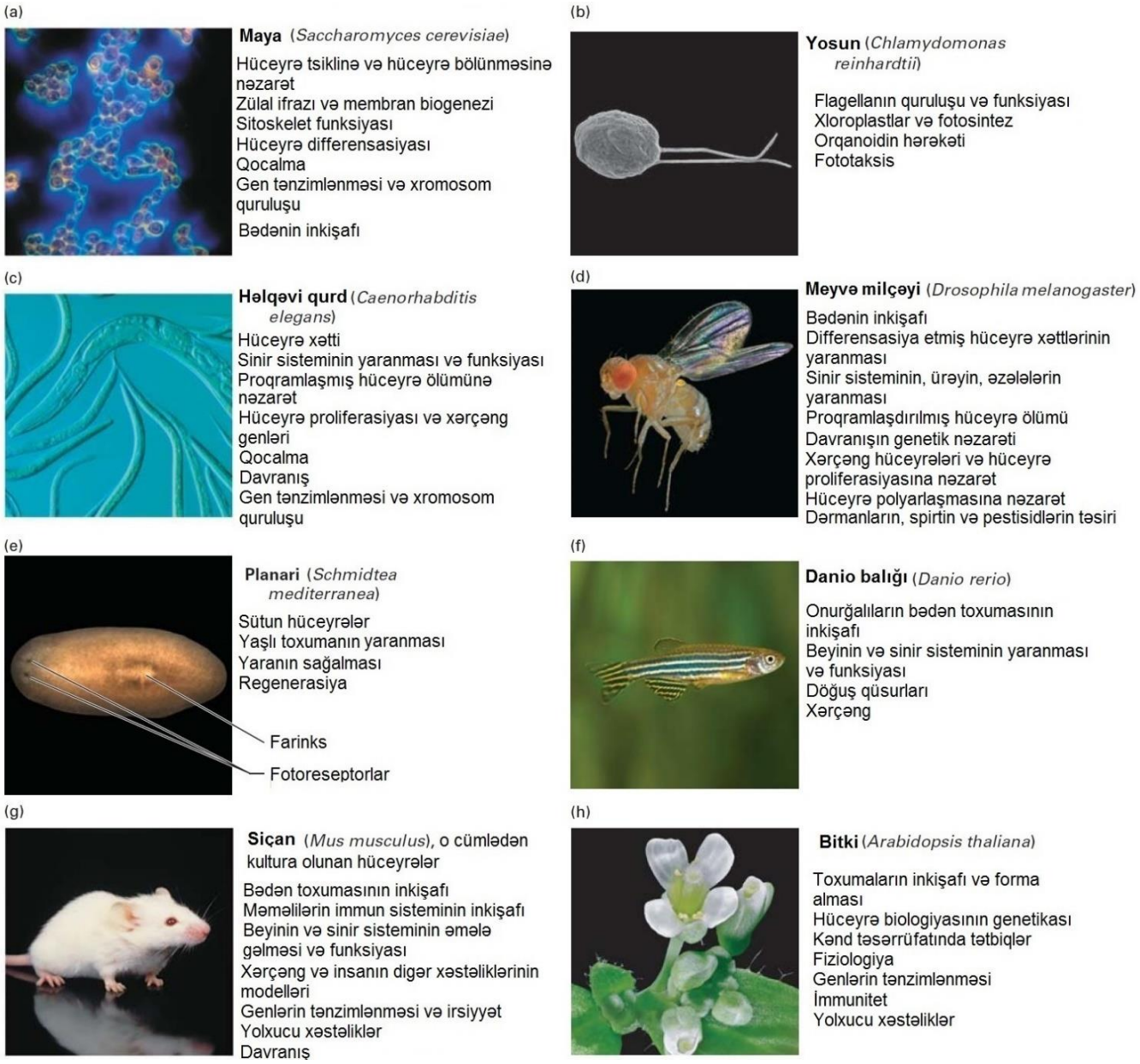
S. cerevisiae kimi bir növün model orqanizm kimi istifadə olunması ilə bütün dünyada on minlərlə tədqiqatçıların müxtəlif eksperimental metodlardan istifadə edərək apardığı tədqiqatların nəticələri, vahid bir hüceyrə üçün daha dərin anlayışları əldə etmək üçün birləşdirilə bilər. Bizim bu kitabda təkrar-təkrar çox görəcəyimiz kimi *S. cerevisiae* üzərində aparılmış təsqiqatlara əsaslanan yekun nəticələr adətən çox hallarda bütün eukariotlar üçün düzgün olur və çoxhüceyrəli heyvanlarda və bitkilərdə daha mürəkkəb proseslərin təkamülinin öyrənilməsinin əsasını formalaşdırır.

Mayada Aparılan Mutasiyalar Əsas Hüceyrə Tsikli Zülallarının İdentifikasiyasına Səbə oldu

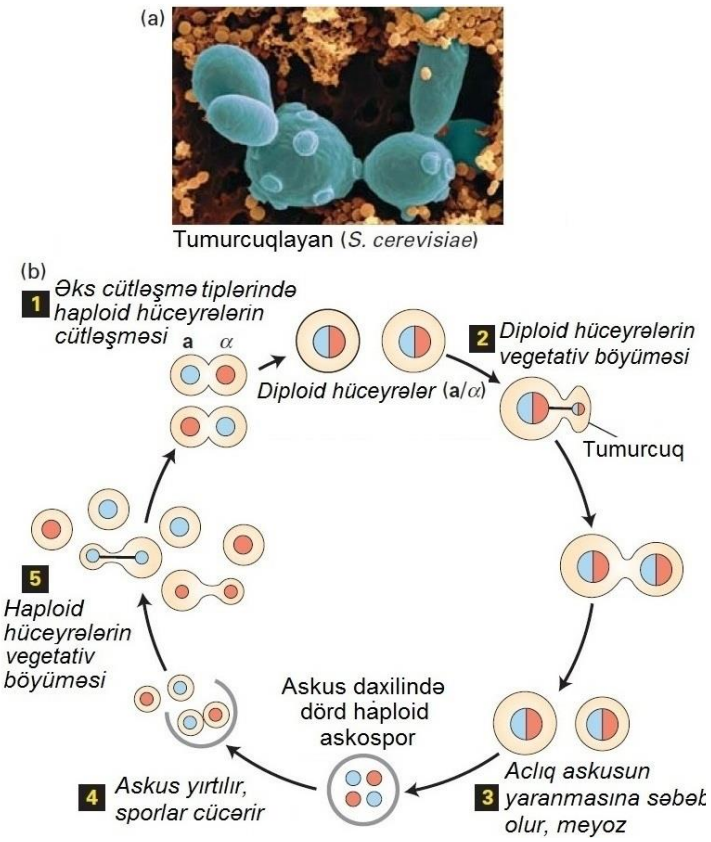
Biokimyəvi tədqiqatlar fərdi zülallar barədə daha çox deyə bilər, amma onlar, bü zülalların hüceyrə bölünməsi üçün və ya başqa funklsiyalar üçün tələb olunduğunu təsdiq edə bilməz. Əgər mutasiya zülalın sintezinə mane olursa və ya onu qeyri funksional edirsə və öyrənilən prosesə arzu olunmayan əks təsir edirsə, o zaman zülalın vacibliyi daha qətiyyətli şəkildə sübut olunur.

Klassik genetik yanaşmada alimlər, normal orqanizmlərin edə bildiyini etmək qabliyyərinə malik olmayan mutantları ayırır və xarakterizə edir. Bəzi prosesləri, məsələn hüceyrə bölünməsini və ya əzələ formalaşmasını həyata keçirmək qabliyyətinə malik olmaya çoxsaylı müxtəlif mutant fərdlərə (məsələn, meyvə milçəyi, maya göbələyi hüceyrələri) baxmaq üçün çox hallarda genetik "ekranlar" yaradılır. Adətən mutasiyalar mutagenlərlə, əsasən təsadüfi mutasiyalara səbəb olan kimyəvi və ya fiziki agentlərlə təsir etməklə alınır. Amma, sağ qalıb yaşamaq üçün mühüm olan hüceyrə bölünməsi kimi bəzi proseslərin gedişi üçün qüsurlu olan mutant orqanizmləri və ya hüceyrələri biz necə ayırıb saxlamalıyıq?

Bir yol, temperatura həssas mutasiyalı orqanizmləri ayırmaqdır. Bu mutantlar *yolverilən temperaturda* inkişaf edə bilirlər, amma, adətən yuxarı temperaturda, yəni *yolverilməyən temperaturda* inkişaf edə bilmirlər. Normal hüceyrələr isə hər iki temperaturda inkişaf edirlər. Əksər hallarda, temperatura həssas mutantlar, yalnız yolverilən temperaturda fəaliyyət göstərə bilən, amma yolverilməyən (yuxarı) temperaturda quruluşu pozulan və fəaliyyət göstərə bilməyən dəyişmiş zülalları istehsal edirlər. Temperatura həssas "ekranlar", genlərin yalnız bir nüsxəsinin olduğu maya göbələyi kimi haploid orqanizmlərlə asanlıqla həyata keçirilir, çünki bu gendə baş verən mutasiyanın nəticəsi dərhal özünü göstərəcək.



ŞƏKİL 1-22 Hüceyrə biologiyasında istifadə olunan hər bir eksperimental orqanizm müəyyən tip tədqiqatlar üçün üstünlüklərə malikdir. *Saccharomyces cerevisiae* maya göbələyi (a) eukariotların hüceyrə təşkilinə malikdir, amma özləri kifayət qədər kiçik sadə birhüceyrəli orqanizmlərdir, ona görə də asanlıqla yetişdirilir və genetik cəhətdən asanlıqla manipulyasiya olunurlar. Yaşıl yosun *Chlamydomanos reinhardtii* (b) fotosintezin və qamçıların quruluşunun və funksiyasının öyrənilməsində çox istifadə olunan orqanizmlərdir. *Caenohabditis elegans* həlqəvi qurdlarda (c) kifayət qədər az sayda olan hüceyrələr demək olar ki, hər bir qurdda eyni cürə düzülmüşdür, hər bir fərdi hüceyrənin formalaşması izlənilə bilər. Meyvə milçəyi *Drosophila melanogaster* (d) ilk dəfə xromosomların xassələrinin öyrənilməsində istifadə etmişlər, embrional inkişafa nəzarət edən genlərin öyrənilməsində (identifikasiyasında) xüsusən əhəmiyyətlidir. Bu genlərin çoxu təkamülün gedişində insanda da qorunub saxlanmışdır. Planaria (e) yastı qurdlar olub bədəninin kəsilmiş istənilən hissəsini, o cümlədən baş və fotoreseptorlar da daxil olmaqla regenerasiya edə bilir. Onlarda yeni hüceyrələri və toxumaları əmələ gətirən sütun hüceyrələr geniş öyrənilir. Zebrafiş *Danio rero* (f) onurğalıların inkişafına və orqanogenezinə nəzarət edən genlərin identifikasiyası üçün tez aparılan genetik ekranlarda istifadə olunur. Eksperimental heyvan sistemlərində siçan (*Mus musculus*) (g) təkamül cəhətdən insana ən yaxın olan orqanizmdir və ona görədə insanın bir sıra genetik xəstəliklərinin və yoluxucu xəstəliklərinin öyrənilməsində model kimi istifadə olunur. Xardal ailəsinə daxil olan alaq otu *Arabidopsis thaliana* (h) bitki həyatının demək olar ki, bütün aspektlərinə daxil olan genləri identifikasiya etmək üçün genetik ekranlarda istfadə olunur. [(a) hissəsi Scimat/Photo Researchers, Inc. (b) hissəsi William Dentler University of Kansas. (c) hissəsi Science Source. (d) hissəsi Darwin Dale/Science Source. (e) hissəsi Peter Reddien, MIT Whitehead Institute. (f) hissəsi blickwinkel/Hartl/Alamy. (g) hissəsi J. M. Labat/Jacana/Photo Researchers, Inc.(h) hissəsi Darwin Dale/Science Source tərəfindən.]



ŞƏKİL 1-23 *Saccharomyces cerevisiae* maya göbələyi həm haploid kimi həm də diploid kimi ola bilir, cinsi və qeyri cinsi yolla çoxala bilirlər. (a) Tumurcuqlayan maya *Saccharomyces cerevisiae*-nın skaninq elektron mikrofotosu. Bu hüceyrələr mitozun qeyri adi tipi – mitoz tumurcuqlama ilə artırlar. Bir qız nüvə "ana" hüceyrədə qalır, digər qız nüvə isə tumurcuğa daşınır və normal ölçüsünə qədər böyüyərək tezliklə yeni hüceyrə kimi azad olur. Hər dəfə yeni tumurcuq hüceyrə ayrıldıqca tumurcuqlama saytında bir şram qalır, ona görə də ana hüceyrənin üzərində əvvəlki tumurcuqlamaların sayını saymaq olur. Narıncı rəngdə rənglənmiş hüceyrələr bakteriyalardır. (b) Haploid maya göbələyi hüceyrələri **a** və **α** adlandırılan müxtəlif cütləşmə tiplərinə malik ola bilirlər, hər iki tip hər bir maya göbələyi xromosomunun bir nüsxəsinə, adi haldakı sayın yarısına malik olurlar və mitoz tumurcuqlama ilə çoxalırlar. Cütləşmə tiplərinə görə fərqlənən iki haploid hüceyrələr, biri **a** digəri isə **α**, bir yerə qovuşa bilir və hər bir xromosomun iki nüsxısinə malik olan **a**/**α** diploid hüceyrəni əmələ gətirirlər; diploid hüceyrələr də mitoz tumurcuqlama ilə çoxalırlar. Aclıq şəraitində diploid hüceyrələr, askosporları yaratmaq üçün bölünmənin xüsusi tipi olan meyoz bölünməyə gedirlər. Askusun qırılması, haploid **a** və **α** hüceyrələrə tumurcuqlaya bilən dörd haploid sporu azad edir. Bunlar həm də qeyri cinsi yolla çoxala bilirlər. [(a) hissəsi SCIMAT/Science Source.]

Haploid maya göbələyi hüceyrələrində hüceyrə bölünməsini dəyişən müxtəlif çoxsaylı temperatura həssas mutasiyaların təsirini analiz etməklə genetiklər, ilkin olaraq onların hansı zülalları kodlaşdırdıqları və ya bu zülalların prosesdə necə iştirak etdikləri barədə heç bir şeyi bilmədən hüceyrə bölünməsi üçün lazım olan genlərin əksəriyyətini aşkar etdilər. Ümumiyyətlə, genetikanın böyük gücü zülalların mövcudluğunu və aktuallığını əvvəlcədən bilmədən, onların identikliyini və molekulyar funksiyasını aşkar etməkdir. "Mutasiya-ilə-təyin olunmuş" bu genlər ayrıla bilər və Fəsil 6-də müzakirə olunan rekombinant DNT metodu ilə replikasiya oluna (klonlaşdırıla) bilər. Ayrılmış gen əldə olunduqdan sonra, kodlaşdırılan zülallar sınaq tyublarında də və yaxud yaradılmış bakteriya və ya hüceyrə kulturalarında da istehsal oluna bilər. Bu yolla biokimyaçılar bu zülalların başqa zülallarla və ya DNT ilə birləşmiş olduqlarını və ya hüceyrə bölünməsi zamanı onların xüsusi kimyəvi reaksiyaları kataliz etmələrini tədqiq edə bilərlər (Fəsil 19).

Bu maya hüceyrə tsikli genlərinin çoxu insan hüceyrələrində də tapılmışdır və kodlaşdırılan zülallar oxşar aminturşu ardıcıllığına malikdirlər. Oxşar aminturşu ardıcıllığına malik olan, amma müxtəlif orqanizmlərdən olan zülallara **homoloji** zülallar deyilir və bunlar eyni və ya oxşar funksiyaya malik ola bilərlər. Göstərilmişdir ki, insanın hüceyrə tsikli zülalları, maya göbələyindəki homoloji zülalları qüsurlu olan mutant maya göbələyində ekspressiya olunanda o "qüsulu mutant hüceyrələri xilas edir" (yəni onların normal inkişafını bərpa edə bilirlər) ki, bu da zülalların müxtəlif tipli eukariotlarda fəaliyyət göstərmək qabliyyətində olduğunu göstərir. Paul Nurse üçün Nobel Mükafatı gətirən bu eksperimental nəticələr, xüsusən qeyd olunmalıdır, çünki görünür bu günki maya göbələyinin və insanın ümumi əcdad hüceyrəsi təxminən milliard ildən artıq bundan öncə yaşamışdır. Aydındır ki, eukariotik hüceyrə tsikli və onu kataliz edən genlər və zülallar çox-çox qədim zamanlarda bioloji təkamülin erkən dövründə yaranmışdır və təkamülin gedişi zamanı uzun zaman müddətində daima (konstant) olaraq saxlanmışdır. Sonrakı tədqiqatlar göstərdi ki, çoxsaylı maya göbələyi hüceyrə tsiklindəki zülallarda olan, nəzarət olunmayan hüceyrə artmasına səbəb olan mutasiyalar tez-tez hallarda insanda xərçəng xəstəliklərində rast gəlinir (Fəsil 24), bu da həmin zülalların bütün eukariotlarda takamülin gedişində qorunub saxlanılmış konservativ funksiyanı yenidən təsdiq edir.

Chlamydomonas reinhardtii Yosunu Beyinin Funksiyasını Öyrənmək üçün Güclü Metodun Yaranmasına Səbəb Oldu

İki uzun qamçılarından istifadə edərək üzən yaşıl birhüceyrəli yosun (Şəkil 1-22b) bu orqanoidlərin (qamçıların) quruluşunun, funksiyasının və toplanmasının öyrənilməsində geniş istifadə olunur. Hazırda müəyyən qədər güclü genetik metodların mümkün olmasına görə *Chlamidomanas* xloroplastların formalaşmasının və fotosintezin tədqiqində də istifadə olunur. *Chlamidomanas* genomu (bax Cədvəl 1-2) maya ilə müqayisədə daha çox zülalları, o cümlədən qamçını əmələ gətirən zülalları və mayada tapılmayan xloroplastları qurmaq üçün lazım olan zülalları kodlaşdırır.

Bu eksperimental orqanizmin istifadə olunmasının bir nəticəsi fototaksisin, orqanizmin işıq mənbəyinə doğru hərəkət etmə və ya işıqdan uzaqlaşma davranışının öyrənilməsindən gəlmişdir. *Chlamidomanas*-a fotosintez etmək üçün və beləliklə böyümək və bölünmək üçün lazım olan enerji mənbəyini yaratmaq üçün işığa doğru hərəkət etmək lazımdır, amma işıq həddən yuxarı intensivlikdə olanda, xloroplastda zədələnmə yaratdığına görə ondan uzaqlaşır. *Chlamidomanas*-da fototaksisin öyrənilməsi plazma membranında iki zülalın aşkar olunmasına səbəb oldu, onlar işığı udarkən membrandakı "kanalı" açırlar, Ca^{2+} kimi ionların hüceyrəxarici mühitdən sitozola axmasına imkan verirlər və fototaktik cavabların başlanmasına səbəb olurlar. Fəsil 22-də ətraflı verildiyi kimi, siçanın beynində spesifik neyronlarda belə bir zülalın ekspressiya olunmasında rekombinant DNT texnologiyasından

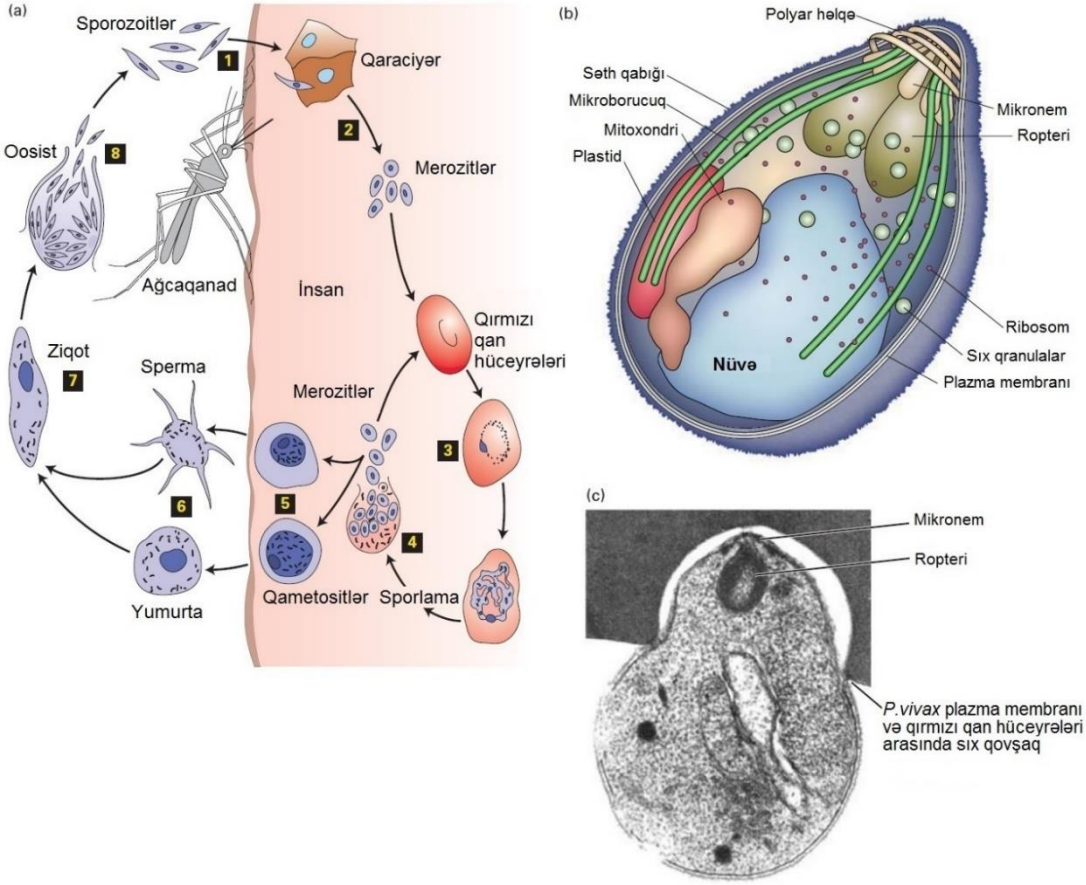
istifadə olundu, və bu, tədqiqatçılara imkan vedri ki, işıq mənbələrindən istifadə edərək beyində çox az hüceyrəni fəallaşdıra bilsinlər. Beləliklə, bu sadə yosun üzərində aparılan tədqiqatlar çox əhəmiyyətli bir sistemin, beyinin funksiyasının öyrənilməsi üçün orqanogenetikanın yaranmasına səbəb oldu.

Malariyanın Yaranmasına Səbəb Olan Parazitlərdə Onların Əhəmiyyətli Həyat Tsiklini Keçməsinə İmkan Verən Yeni Orqanoidlər Vardır

Maya çörək, pivə, şərab və pendir istehsalında istifadə olunduğu halda bəzi birhüceyrəli eukariotlar əsas insan xəstəliklərinin yaranmasına səbəb olur və onları öldürən, amma onların insan sahiblərini zədələməyən dərman preparatlarının yaradılması üçün geniş tədqiq olunurlar. *Entamoeba histolitica* dizenteriyaya səbəb olur, *Trichomonas vaginalis* vagina (uşaqlıq yolu) infeksiyasına, *Trichomonas brucea* yuxululuq xəstəliyinə əmələ gətirir. Hər il bu ibtidailərin ən pisi, *Plasmodium falciparum* və ona yaxın olan növlər 300 milliondan artıq malariya yoluxmasına səbəb olurlar, bu xəstəlik hər il 1.5 milliondan 3 milliona qədər insanı öldürür. Bu ibtidailər alternativ olaraq məməlilərdə və ağcaqanadlarda yaşayaraq öz morfologiyasını və davranışını bu orqanizmlərdəki mühitdən gələn siqnala uyğun olaraq dəyişirlər.

Plasmodium-un mürəkkəb həyat tsikli tək bir hüceyrənin müxtəlif həyat şəraitlərinə necə uyğunlaşmasını çox gözəl təsvir edir (Şəkil 1-24a). Bundan əlavə, insanın qırmızı qan hüceyrələrini yoluxduran *merozoit* formanın başqa eukariotlarda tapılmayan və parazitin qırmızı qan hüceyrələrinə soxulmasını mümkün edən bir sıra orqanoidləri, o cümlədən roptriyası, polyar halqası və mikronemi, həmçinin hüceyrənin xarici səthində qeyri-səlis örtüyü vardır (Şəkil 1-24b, c). Parazitin qırmızı qan hüceyrəsinə daxil olması parazitin müəyyən hüceyrə-səth zülallarının qırmızı qan hüceyrələrinin səthində olan zülallara birləşməsi ilə inisiasiya olunur və ardınca iki plazma membranı arasında sıx qovşaq əmələ gəlir, "qeyri-səlis örtük" itirilir, membranda və ropotriyada olan zülalların ifraz olunması baş verir.

Plasmodium-un həyat tsiklində meydana gələn hüceyrə tipində olan bütün transformasiyalar bu parazitin genetik materialında kodlaşdırılan təlimatlarla (qaydalarla) idarə olunur (bax Cədvəl 1-2). Plazmodumun genomu *Saccharomyces cerevisiae* mayada olan eyni sayda zülal kodlaşdıran genlərə malikdir, amma plazmodium genlərinin üçdə ikisi bu və buna yaxın olan parazitlər üçün unikaldır və bu parazitlər, Apikompleksə (bax Şəkil 1-1) və digər eukariotların çoxluğu ilə onların mürəkkəb həyat dövrləri üçün tələb olunan qeyri-adi orqaneoidlərin olması ilə bağlı böyük təkamül uzaqlığını sübut edir.



ŞƏKİL 1-24 Malariyanı əmələ gətirən *Plasmodium* növləri diqqətəlayiq həyat tsiklinə malik olan bir hüceyrəli ibtidaidir. Çox *Plasmodium* növləri məlumdur və onlar həşaratlarla heyvanlar arasında dövr edərək müxtəlif heyvanları yoluxdura bilirlər. İnsanda malariya əmələ gətirən dörd növ öz insan və ağcaqanad sahibləri arasında dramatik transformasiyaya məruz qalır. (a) Həyat tsiklinin diaqramı. Pillə 1: Yoluxmuş *Anopheles* ağcaqanadı insanı sancdıqda sporozoitlər insan sahibə keçirlər. Pillə 2: Onlar qaraciyərə miqdarsiya edir, orada inkişaf edib merozitlərə çevrilirlər və qana buraxılırlar. Merozitlər sporozoitlərdən əhəmiyyətli dərəcədə fərqlənirlər, belə ki,

metamorfoza transformasiya edirlər (Yunancadan "transformasiya etmə" və ya "çox forma almaq"). Pillə 3: Merozoitlər dövr edərək qırmızı qan hüceyrələrinə (QQH) hücum edirlər və onun daxilində çoxalırlar. Bəzi *Plasmodium* növlərinin istehsal etdikləri zülallar yoluxmuş QQH səthinə keçir və bu hüceyrələrin qan damarları divarlarına yapışmasın səbəb olur. Bu yapışma yoluxmuş qan hüceyrələrinin dalağa daxil olmasına mane olur və orada immun sisteminin hüceyrələri tərəfindən QQH-lərin və onlarda olan *Plasmodium* orqanizmlərin dağılmasına mane olur. Pillə 4: Hər bir *Plasmodium* növləri üçün xarakterik olan müəyyən zaman müddətində QQH-lərində böyüdükdən və çoxaldıqdan sonra merozoitlər birdən böyük miqdarda yoluxmuş hüceyrələrdən sinxron şəkildə buraxılır (çıxırlar). Məhz bu hadisə malariyanın yaxşı məlum olan simptomlarını temperaturun qalxmasını, üşümə titrəməsini əmələ gətirir. Azad olmuş merozoitlərdən bəziləri əlavə QQH-ləri yoluxdurur, çoxalma və yoluxdurma tsiklini əmələ gətirir. Pillə 5: Sonda merozoitlərin bəzilərində meyoz baş verir və başqa bir metamorfoza, dişi və erkək qametositlərə inkişaf edirlər. Adi xromosom sayının yarısına malik olan bu hüceyrələr *Anopheles* ağcaqanadına keçmədən uzun müddət yaşaya bilmirlər. Pillə 6: Ağcaqanadın mədəsində qametositlər spermaya və ya yumurtaya (qametlərə) çevrilir, bu spermada tük şəkilli qamçının inkişaf etdiyi yeni metamorfozdur. Pillə 7: Sperma ilə yumurtanın qovuşması ziqotu yaradır, o isə mədə divarının hüceyrələri daxilinə implant olunur (daxil olur) və inkişaf edərək oositlərə, sporozitlərin əmələ gəlməsi üçün çox vacib olan "fabriklərə" keçir. Pillə 8:Oositlərin dağılması ilə minlərlə sporositlər azad olur və tüpürcək vəzlərinə miqrasiya edirlər və yeni insan sahibin yoluxması mərhələsini təşkil edirlər. (b) *Plasmodium vivax* merozoitin orqanoidləri. Bu orqanoidlərin bəziləri yalnız *Plasmodium* və buna yaxın olan eukariotik parazit mikroorqanizmlərdə tapılmışdır. (c) İnsanın qırmızı qan hüceyrələrinə soxulan *Plasmodium vivax* merozoitin kəsiyi. Bax A. Cowman and B. Crabb, 2006, *Cell* **124**:755–766. [(c) hissə Masamichi Aikawa.]

1.5 Çoxhüceyrəlilərin Quruluşu, Differensasiyası və Model Orqanizmlər

Çoxhüceyrəli orqanizmlərin təkamüli çox güman ki, hüceyrələr bölündükdən sonra ayrı-ayrı fərdi hüceyrələrə ayrılmaq əvəzinə kiçik koloniyalarda birləşmiş şəkildə yaşadığı zamandan başlamışdır. Çox az sayda prokariotlar və bir neçə birhüceyrəli eukariotlar, məsələn *Volvex* (bax Şəkil 1-3d) və eləcə də çoxsaylı göbələklər və kif göbələkləri bu cürə rudimentar sosial (ümumi) davranışı nümayiş etdirirlər. Amma, çoxhüceyrəliliyin tam çiçəklənməsi eukariotik orqanizmlərdə hüceyrələrin tam differensasiya etdikdən və ixtisaslaşmış ümumi funksiyaları yerinə yetirdiyi qruplarda və ya toxumalarda təşkil edildiyi andan meydana çıxmışdır.

Çoxhüceyrəlilik Hüceyrə-Hüceyrə və Hüceyrə-Matrisa Adgeziyasını Tələb Edir.

Ali bitkilərin hüceyrələri hüceyrələri əhatə edən, bir-birini toxunan hüceyrə divarları tərəfindən əmələ gələn kameralar şəbəkəsində yerləşirlər və **plazmodesmata** adlı sitoplazmik köprülər vasitəsilə əlaqəlidirlər (bax Şəkil 1-12a). Heyvan hüceyrələri çox zaman onların səthində olan və **hüceyrə adgeziya molekulları** və ya **CAM** adlanan hüceyrə adgeziya zülalları vasitəsi ilə zəncir, kürə və ya vərəq (təbəqə) daxilində bir yerə "yapışırlar" (bax Şəkil 1-4d). Bəzi CAM-lar hüceyrələri bir-biri ilə birləşdirir, başqa tip CAM-lar hüceyrələri hüceyrəxarici matrisaya bağlayır və yapışqan mühiti əmələ gətirirlər. Heyvanlarda matrisa hüceyrələrdə yastıq (yumuşaq materiya) rolunu oynayaraq qida maddələrinin onlara doğru diffuziya etməsinə və tullantı materiallarının onlardan uzaqlaşdırılmasına imkan verir. İxtisaslaşmış, bazal lamina adlanan, polisaxaridlərdən və kollagen kimi çoxsaylı zülallardan təşkil olunmuş xüsusi kobud (bərk) matrisa hüceyrə vərəqələrinin əsasını təşkil edən dəstəkləyici təbəqəni təşkil edir və hüceyrə aqreqatlarının ayrılmasına mane olur (bax Şəkil 1-4). İnsanlarda tapılmış çox CAM-lar və hüceyrəxarici-matrisa zülalları onurğasızlarda da tapılmışdır, bu da onların metazoanların təkamülündə olan əhəmiyyətini göstərir. Buna oxşar olaraq, metazoanların siqnal molekulları kimi istifadə etdikləri çox zülallar və kiçik molekullar insanda və çox onurğasızlarda onların bu siqnal molekullarına birləşən və siqnalı qəbul edən hüceyrədə təsiri həyata keçirən hüceyrə zülalları olan **reseptorları** kimi qorunub saxlanmışdır. Bir nümunə kimi, Fəsil 16-da müzakirə olunan Wnt siqnal zülalı eyni zamanda həm *Drosophola*-nın Wngless mutantında mutasiya olunmuş gen kimi, həm də siçanda xərçəng-yaradan virusun inteqrasiya saytı kimi aşkar edilmişdir.

Epiteli Təkamülün Erkən Dövründə Yaranmışdır

Okeanabənzər duzlu mühitdə yaranıb inkişaf etdiyi güman olunan metazoanlar bir fundamental problemi həll etmək məcburiyyətində qaldı: orqanizmin daxilini xaricdən ayırmaq. Bütün metazoan heyvanların xarici səthi, eləcə də onların daxili orqanlarının səthi epiteli adlanan toxumanın vərəq şəkilli təbəqəsi ilə örtülüdür. Epiteli, dərini əmələ gətirən epidermal hüceyrələr kimi adətən baryer və müdafiə səthi rolunu oynayır (bax Şəkil 1-4). Başqa epitelilər bir hüceyrə təbəqəsi qalınlıqda olub kiçik bağırsaq kimi daxili orqanları örtür, orada həzm məhsullarının (məsələn, qlükoza və amin turşuları) qana daşınmasında mühüm rol oynayır (bax Fəsil 11). Fəsil 20-də müzakirə olunduğu kimi, müxtəlif bədən nahiyələrində epiteli xarakterik morfologiyaya və funksiyaya malikdir.

Epiteli toxumasını əmələ gətirən hüceyrələrin plazma membranı ən azı iki diskret zonaya ayrıldığından onlara *polyarlaşmış* (*qütbləşmiş*) deyilir. Adətən polyarlaşmış epiteli hüceyrələrinin fərqli səthləri var, xarici aləmə baxan "yuxarı" apikal hüceyrə səthi və orqanizmin daxilinə baxan bazal və lateral səthlər (ümumilikdə bazolateral səth adlanır). Şəkil 1-4-də göstərildiyi kimi, bazal səth adətən altda yerləşən hüceyrəxarici matrisaya, bazal laminaya bağlanır. Bazolateral plazma membranında xüsusi qovşaq zülalları yaxın bitişik hüceyrələri bir-biri ilə əlaqələndirir və hüceyrəni bazal laminaya bağlayır.

Toxumalar Orqanlarda Təşkil Olunurlar

Metazoanlarda hüceyrələr təcrid vəziyyətində işləmirlər, differensasiya etmiş hüceyrələrin ixtisaslaşmış qrupu çox zaman birlikdə toxumaları əmələ gətirirlər, onlar isə orqanların əsas komponentləridirlər. Məsələn, kiçik qan damarının lümeni qan hüceyrələrinin damardan kənara axmasına mane olan endotelial hüceyrələrin nazik vərəq-şəkilli təbəqəsi və ya **endoteli** ilə örtülüdür (Şəkil 1-25). Saya əzələ toxuması təbəqəsi endotelini

və bazal laminanı əhatə edir və qan axmasını məhdudlaşdırmaq üçün yığılır. Qorxma (diskinmə) zamanı kiçik periferial damarların yığılması mühüm orqanlara daha çox qan axmasını təmin edir. Qan damarlarının əzələ qatı qan damarlarının divarlarını əhatə edən liflərin və hüceyrələrin şəbəkəsi olan və onları dartılmaqdan və qırılmaqdan qoruyan birləşdirici toxumanın xarici təbəqəsinə sarınmışdır.

Toxumaların belə ierarxiyası təbəqələrinin qalınlığına görə fərqlənən başqa qan damarlarına da köçürülür. Əsas arteriyanın divarı daha çox stressə davam gətirməlidir və ona görə də kiçik damarlardakına nisbətən daha qalındır. Müxtəlif toxumaların təbəqələşməsi və qruplaşması strategiyası başqa mürəkkəb orqanların da qurulmasında istifadə edilir. Hər bir halda, orqanın funksiyası komponent toxumaların spesifik funksiyası ilə təmin edilir, və toxumada olan hər bir tip hüceyrə toxumanın öz funksiyasını yerinə yetirməsini mümkün edən spesifik qrup zülalları istehsal edir.

Genomiks Metazoan Təkamülünün və Hüceyrə Funksiyasının Əhəmiyyətli Aspektlərini Aşkar Etdi

Metazoanlar – istər *Drosophila melanogaster* və həlqəvi qurd *Caenorhabditis elegans* kimi onurğasızlar, istərsə də siçan və ya insan kimi onurğalılar 13000-dən 23000 qədər zülal koslaçdıran genlərə malik olurlar, bu maya göbələyindəkinə nisbətən təxminən üç və ya dörd dəfə çoxdur (Cədvəl 1-2). Tam genom ardıcıllığının oxunması göstərdi ki, bu genlərin əksəriyyəti matazoanlar arsında konservativdirlər və genetik tədqiqatlar göstərdi ki, onların çoxu xüsusi toxumaların və orqanların formalaşmasında və funksiyasında əhəmiyyətlidirlər. Beləliklə Cədvəl 1-2-də göstərilən orqanizmlərin çoxu bu saxlanılmış konservativ zülalların hüceyrənin inkişafı və funksiysındakı rolunun öyrənilməsində istifadə edilir.

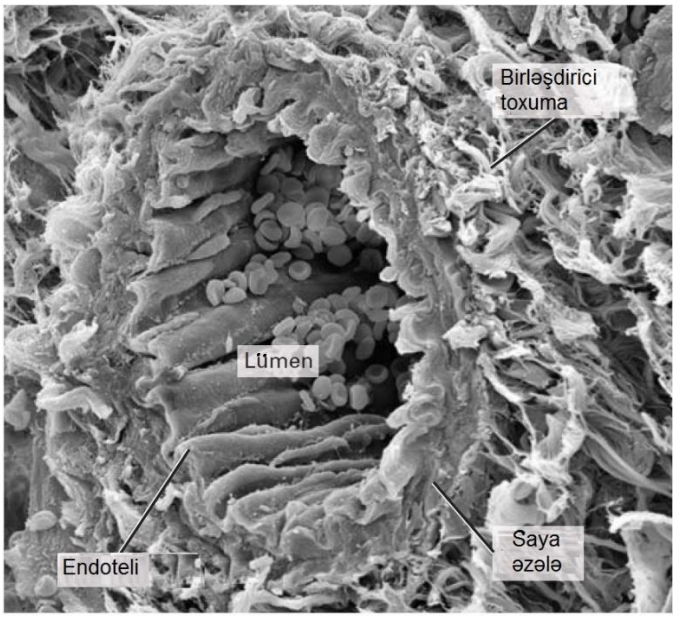
Insanın və siçanın genomu hlqəvi qurd *Caenorhabditis elegans*, qurbağalar və balıqlar kimi təxminən eyni sayda zülalları kodlaşdırırlarsa da, məməlilərin hüceyrələri həlqəvi qurdlardan təxminən 30 dəfə artıq, qurbağa və balıqlardan isə iki-üç dəfə artıq DNT-yə malikdir. İnsan genomunun yalnız təxminən 10 faizə qədəri zülal kodlaşdırır. Biz indi bilirik ki, qalan 90 faizin əksər hissəsi əhəmiyyətli funksiyaya malikdir. Çox DNT seqmentlərinə yaxınlıqdakı genlərin ekspressiyasını tənzimləyən zülallar birləşirlər və məməlilərin hər bir geninin hər bir hüceyrə tipi üçün lazım olan dəqiq sayda mRNT və zülal istehsal etməsinə imkan verirlər.

DNT-nin başqa seqmentləri gen ekspressiyasında funksiyaları yalnız son zamanlar aşkar edilməyə başlayan minlərlə RNT molekullarının sintezində istifadə edilir. Məsələn, yüzlərlə müxtəlifb tipli mikro-RNT-lər 20-25 nukleotid uzunluqda olub metazoanların hüceyrələrində çox zəngindir və hədəf mRNT-yə birləşərək onun fəallığını repressiya edirlər. Bu kiçik RNT-lər ya mRNT-nin zülala translyasiya olunmasını ingibirləşdirməklə ya da hədəf mRNT-lərin parçalanmasına səbəb olmaqla dolayı yolla genlərin əksəriyyətinin və ya hamısının fəallığını tənzimləyirlər (Fəsil 10).

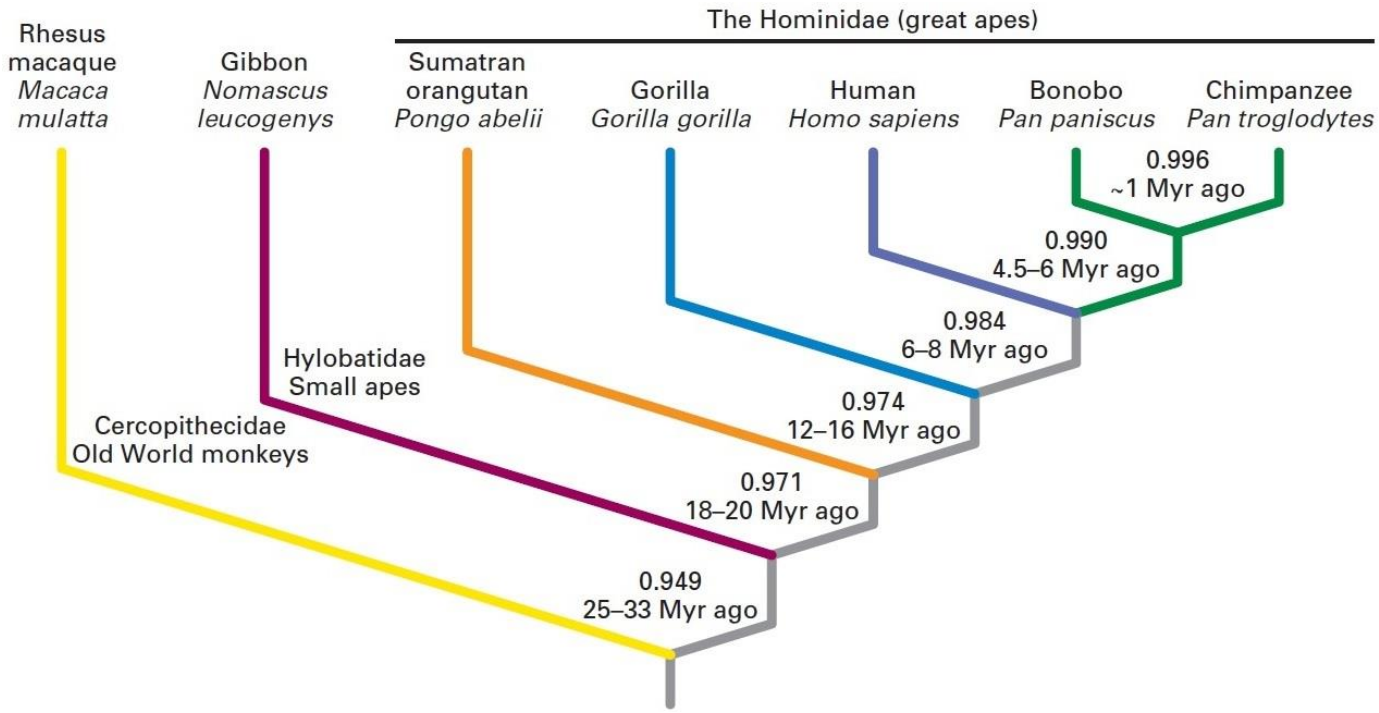
Bu zülal-kodlaşdırmayan DNT-lərin bəziləri demək olar ki, bizi unikal insan edən genlərin ekspressiyasını tənzimləyir. Həqiqətən də, balıq və insanlar təxminən eyni sayda zülal-kodlaşdıran genlərə malikdirlər – təxminən 20000 – amma, yuxarıda qeyd edildiyi kimi, insanın genomu balıq genomundan təxminən iki dəfə böyükdür (bax Cədvəl 1-2). İnsanın beyni, kitab oxumaq və yazmaq kimi mürəkkəb zehni prosesləri həyata keçirə bilir. Necəsə, bu 20000 insan geni elə şəkildə dəqiqliklə tənzimlənir ki, insan 100000000000 neyronlardan və əlavə olaraq *sinapsislər* adlanan 100000000000000 qarşılıqlı əlaqə saytlarından ibarət olan beyni istehsal edir.

Orqanizmin tam DNT ardıcıllığını öyrənən genomiks insanların bizə yaxın olan qohumlarımıza, meymunlara (apes) necə yaxın olduğunu göstərdi (bax Şəkil 1-26). İnsanın DNT ardıcıllığı şimpanzenin və bonobanın DNT ardıcıllığı ilə 99 faiz identiklik təşkil edir, burada 1 faiz fərq 3000000 əsas cütüdür, amma bu necəsə, bizim sonuncu ümumi əcdadımızdan ayrıldığımız son 5000000 il ərzində insan beyninin təkamülü kimi növlərimiz arasındakı labüd fərqləri aşkar edir.

Genomiks və onunla birləşən palentoloji tapıntılar birlikdə göstərirlər ki, insan və siçan təxminən 75 million il əvvəl yaşamış ümumi əcdaddan ayrılmışlar. Bununla belə, hər iki orqanizm təxminən eyni sayda genə malikdir və siçan-zülalını kodlaşdıran genlərin təxminən 99 faizi insan genləri ilə və ya



ŞƏKİL 1-25 Bütün orqanlar, kiçik arteriyanın (arteriol) çarpaz kəsiyində göstərildiyi kimi, müxtəlif toxumaların düzülüşündən təşkil olunmuşlar. Qan endotelial hüceyrələrin endetelini əmələ gətirən nazik təbəqəsi ilə örtülü olan və ondan altda olan bazal laminadan təşkil olunmuş qan damarı lümeni ilə axır. Bu toxuma onun üstündə olan saya əzələ toxumasına yapışmışdır, əzələ təbəqəsinin yığılması qanın qan damarları ilə axmasını nizamlayır. Birləşdirici toxumanın fibrilyar (lifli) təbəqəsi damarı əhatə edir və onu başqa toxumalara birləşdirir. [SPL/Science Source.]



ŞƏKİL 1-26 Meymunları, insanabənzər meymunları və insanı birləşdirən təkamül ağacı. İnsanların, böyük insanabənzərlərin, kiçik insanabənzərlərin və Qədim Dünyanın meymunlarının təkamül ağacı onların genom DNT ardıcıllıqları arasındakı divergensiyalarına əsasən qurulmuşdur. Tam-genom DNT ardıcıllığı düzlənmiş və vahid DNT ardıcıllığında olan orta nukleotid divergensiyası hesablanmışdır. Hər bir buğumda DNT ardıcıllığının identifikasiyasına əsasən, göstərilən müxtəlif növlərin bir-birindən uzaqlaşması zamanının hesablamaları milyon illərlə (Mli) göstətilmişdir. ~1 Myr təxminən 1 million və ya za ili göstərir. [Verilənlər D.P. Locke et al., 2011, *Nature* **469**:529.]

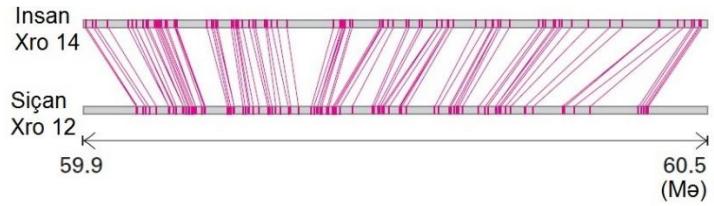
əksinə homologiya təşkil edirlər. İnsan və siçan genomlarının 90 faizindən çoxu sinteni rayonlaraına, yəni xromosomun bir hissəsi boyunca eyni qaydada unikal DNA ardıcıllıqları və genləri olan DNT seqmentlərinə ayrıla bilir. Bu müşahidələr göstərir ki, insanın və siçanın son ümumi acdadındakı gen ardıcıllığının əksəriyyəti hər iki növdə qorunub saxlanılmışdır (Şəkil 1-27). Təbii ki, siçanlar insanlar deyillər, insanlara nisbətən siçanlar immun sisteminə, çoxalmaya və qoxubilməyə aid olan genlərin daha geniş ailəsinə malikdirlər, yəqin ki, buda insanların və siçqanların həyat tərzindəki fərqlərdə əks olunur.

Bizi maraqlandıran yalnız insanın təkamülü deyil! Qütb ağ ayıları Arktikada yaşayırlar və əsasən suitilərdən ibarət olan yüksək dərəcədə piyli qida ilə qidalanırlar. Son zamanların genom analizi tədqiqatçılara belə bir nəticəyə gəlməyə imkan verdi ki, ağ ayıların onların yaxın qohumu, mülayim temperatur iqlimində yaşayan bugünkü qonur ayıların ən yaxın əcdadı 500000 il və ya təxminən 20000 ayı generasiyası (nəsli) bundan öncə yaşamışdır. Amma bu qısa təkamül dövründə ağ ayının genomu ürək-damar fəaliyyətini, piy metabolizmini və ürək inkişafını tənzimləyən çox genlərdə dəyişikliklər qazanmışdır və onlara imkan vermişdir ki, piylə zəngin olan qida rasionunu istifadə edə bilsinlər.

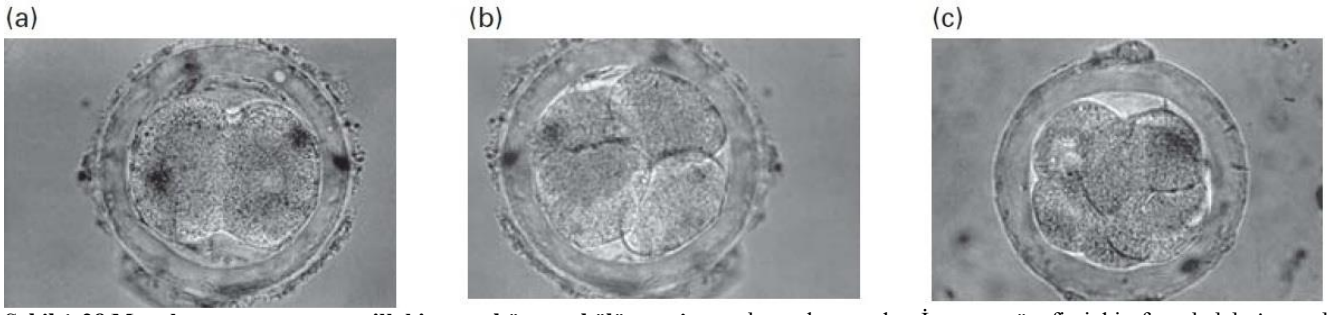
Embrional İnkişaf Master Transkripsiya Faktorlarının Konservativ Dəstindən İstifadə Edir

Diqqətli oxucu əvvəlki müzakirələrdə bir paradoksu qeyd edəcək: əgər həqiqətən də insanın zülal-kodlaşdıran genləri insanabənzər meymunların və siçanın, həmçinin çox milçəyin və qurdların genləri ilə yaxındırlarsa, o zaman bu orqanizmlər nəyə görə bu qədər fərqli görünüşə və funksiyaya malikdirlər? Bu sualın cavabı bütün metazoanlarda orqanizmlərin tək bir hüceyrədən, mayalanmış yumurtadan inkişafının gedişi zamanı genlərin tənzimlənməsi yolunda yerləşir. Biz Fəsil 8 və 9-da öyrənəsəyik ki, hər bir zülal-kodlaşdıran gen müxtəlif orqanizmlərdə fərqlənən tənzimləyici DNT ardıcıllığı ilə assosasiyadadır. Bu tənzimləyici ardıcıllıqların çoxu spesifik hüceyrə tipində genin ekspressiyasını və beləliklə də onun istehsal etdiyi zülalın miqdarını istiqamətləndirən zülallara birləşirlər. Bu zülallardan bəziləri *master transkripsiya faktorları* adlandırılır, bu zülallar tənzimləyici DNT ardıcıllığına birləşirlər, təkamül gedişində qorunub saxlanmışlar və çox zaman inkişafın müxtəlif mərhələlərində genlər qrupunu fəallaşdırmaq və ya repressiya etməklə spesifik hüceyrə tiplərinin inkişafını nizamlayırlar.

İnsasn embrionu inkişafının erkən mərhələləri siçandakına oxşardır. Onlara rüşeymin inkişafının erkən mərhələsi sürətli hüceyrə bölünməsi (Şəkil 1-28) və hüceyrələrin toxumaya differensasiya olunması ilə xarakterizə olunur. Bütün orqanizmlərdə embrional *bədən planı,* hüceyrə (toxuma) tiplərinin məkana görə paylanması və bədən hissələri iki təsirdən yaranır: bədən formasını təyin edən genlərin proqramı, və yerlərdə (lokal) hüceyrələrin qarşılıqlı əlaqəsi, hansıki proqramın müxtəlif hissələrini induksiya edir.



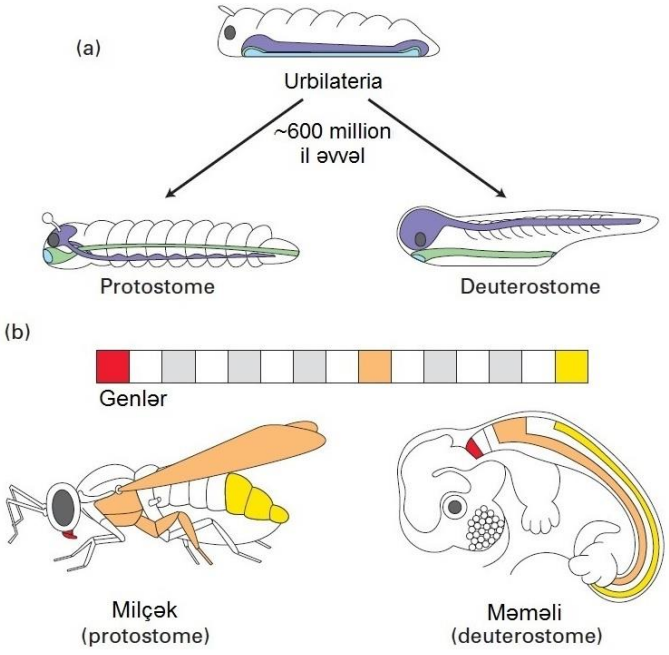
Şəkil 1-27 İnsan və siçan arasında sinteni konservasiyası. Göstərilən, siçanın 12-ci xromosomunun 510000 əsas cütü (əc) uzunluqda seqmentidir, ümumi əcdada görə insanın 14-cü xromosomunun 600000 əc bölməsi ilə bölüşür (oxşardır). Çəhrayı xəttlər qarşılıqlı (resiprokal) unukal DNT ardıcıllıqlarını iki genomda birləşdirir. Mə, 1 million əsas cütü [Siçanın Genom Ardıcıllığı Konsortumdan, 2002, *Nature* **420**:520.]



Şəkil 1-28 Mayalanmış yumurtanın ilk bir neçə hüceyrə bölünməsi sonrakı inkişafın mərhələlərini müəyyən edir. Siçanın inkişaf edən rüşeyimi (embrionu): (a) iki hüceyrə, (b) dörd hüceyrə, (c) səkkiz hüceyrə mərhələlərində göstərilir. Rüşeyim köməkçi membranlarla əhatə olunmuşdur. İnsanın müvafiq inkişaf mərhələləri mayalanma olduqdan sonrakı ilk bir neçə gün ərzində baş verir. [Claude Fedelmann/Photo researchers, Inc.]

Yalnız bir neçə istisna ilə, heyvanların çoxu aksial simmetriya nümayiş etdirirlər, bu onlarda sağ və sol tərəflərinin bir-birinin güzgüdəki əksi kimi yaxın olduğunu göstərir. Bu ən əsas formalar genomda kodlaşdırılır. İnkişafın biologiyasını öyrənən tədqiqatçılar simmetrik heyvanların tiplərini (phyla) rüşeyimin erkən inkişaf dövründə ağızın və anusun harada əmələ gəlməsindən asılı olaraq bilateral (ikitərəfli) şəkildə iki böyük qurupa bölürlər. Birinci qrupda, **protostomlar**da erkən embrionda yaranan müvəqqəti yarığın (**blastopor**) çox yaxınlığında ağız inkişaf edir və ventral (qarın) sinir sisteminə - xordaya malik olurlar; protostomlara bütün qurdlar, həşaratlar və molyusklar aiddirlər. İkinci qurupda, **deuterostomlar**da erkən embrionda bu müvəqqəti yarığın çox yaxınlığında anus inkişaf edir və dorsal mərkəzi sinir sisteminə malik olurlar; bunlara exinodermlər (dəniz ulduzu və dəniz kirpisi kimi) və onurğalılar aiddirlər. Həm protostomlarin həm də deuterostomların bədənləri, rüşeyimin erkən inkişafı dövründə formalaşan diskret seqmentlərə bölünürlər. Çox güman ki, protostomlar və deuterostomlar, təxminən 600 million il öncə yaşamış, **Urbilateriya** adlanan ümumi əcdaddan yranıb inkişaf etmişlər (Şəkil 1-29a).

Forma yaradan çox genlər genlərin ekspressiyasına nəzarət edən və orqanizmin əsas bədən sütunundan başlayaraq — anterior–posterior, dorsal–vertal, sol–sağ — və baş, döş, qarın və quyruq kimi bədən seqmentləri ilə qurtaran quruluş təşkilini dəqiqləşdirən master transkripsiya faktorlarını ekspressiya edirlər. Sadə qurdlardan məməlilərə qədər aksial simmetriyanın qorunub saxlanılması (konservasiyası) onların genomunda konservativ forma yaradan genlərin olması ilə izah olunur. Bəzi forma yaradan genlər, başqa genlərin ekspressiyasına nəzarət edən zülalları kodlaşdırır; başqa forma yaradan genlər isə, hüceyrələrin yapışmasında (adgeziyasında) və ya hüceyrə siqnal sistemində əhəmiyyətli olan zülalları kodlaşdırır. Forma əmələ gətirən genlərin belə geniş repertuarı inkişafda olan rüşeyimin müxtəlif hissələrində hadisələrin inteqrasiyasına və koordinasiyasına imkan verir və bədəndə hər bir seqmentə onun unikal identikliyini verir.



Şəkil 1-29 Təkamülün gedişində qorunub saxlanmış oxşar genlər çox böyük müxtəliflikdə heyvanlarda inkişafın erkən proseslərini tənzimləyir. (a) Urbilateriya 600 million il öncə yaşamış bütün protostomların və deuterostomların ehtimal olunan əcdadıdır. Sinir xordasının tutduğu yer (bənövşəyi), səth ektoderması (əsasən dəri, ağ rəng) və endoderma (əsasən həzm böşluğu və orqanlar, aşıq yaşıl) göstərilir. (b) **Hox** zülallar adlanan yüksək konservativ zülallar həm proteostomlarda həm də deuterostomlarda tapılmışdır və embrional inkişaf dövründə bədən seqmentlərinin identikliyini müəyyən edirlər. *Hox* genlər heyvanların çoxunun və ya hamısının xromosomlarının klasterlərində tapılmışlar və başqa genlərin fəaliyyətini tənzimləyən

müvafiq transkripsiya faktorlarını kodlaşdırırlar. Çoxsaylı heyvanlarda *Hox* genlər, müvafiq rənglərlə göstərildiyi kimi, müxtəlif seqmentlərin inkişafını başdan-quyruğa ox boyunca istiqamətləndirirlər. Hər bir gen, başdan-quyruğa ox boyunca xüsusi rayonda fəallaşdırılır (transkripsiya səviyyəsində) və oradakı toxumaların inkişafını tənzimləyir. Məsələn, deuterostomlara aid olan siçanlarda *Hox* genlər onurğalıların müxtəlif formalarının yaranması üçün məsul genlərdir. Protostomlara aid olan meyvə milçəyində *Hox* geninə təsir edən mutasiyalar bədən hissələrinin düzgün olmayan yerdə yaranmasına səbəb olmuşdur, məsələn, ayaqların başdakı antenalarda olduğu kimi. Hər iki orqanizmdə bu genlər başdan-quyruğa "ünvanı" təmin edir, müvafiq nahiyələrdə quruluşun formalaşmasının yönəldilməsinə xidmət edir.

Olduqca maraqlıdır ki, çox hallarda "master transkripsiya faktorları" adlandırılan çoxlu miqdarda forma yaradan genlər həm protostomlarda həm də deuterostomlarda yüksək dərəcədə saxlanılmışdır (konservativdir) (Şəkil 1-29b). Bədən planının bu cürə konservasiyası müxtəlif orqanizmlərin inkişafına nəzarətin molekulyar və hüceyrə mexanizmindəki ümumi cəhətləri qoruyub saxlamaq üçün təkamül təzyiqini ozündə əks etdirir. Milçəyin gözləri və insanın gözləri quruluşuna, funksiyasına və sinir sistemi ilə bağlılığına görə çox müxtəlifdir. Bununla belə, "master tənzimləyici genlər" adlanan və gözün yaranıb inkişafını inisiasiya edən - milçəkdə *eyeless*, insanda isə *Pax6* - bir-birinə çox yaxın olan, başqa genlərin fəallıqlarını tənzimləyən transkripsiya faktorunu kodlaşdırırlar və eyni əcdad gendən törəmişlər. *Eyeless* və ya *Pax6* genlərdə mutasiyalar gözlərin formalaşmasında əsas qüsurların yaranmasına səbəb olurlar (Şəkil 1-30).

Planariya Sütun Hüceyrələrin və Toxuma Regenerasiyasının Tədqiqində İstifadə Olunur

Bir-hüceyrəli orqanizmlərdə hər iki qız hüceyrə adətən (hərçənd ki, həmişə yox) valideyin hüceyrəyə oxşayır. Buna oxşar olaraq, məsələn qaraciyər hüceyrələri bölünərək valideyin hüceyrə ilə eyni xüsusiyyətə və funksiyaya malik olan qaraciyər hüceyrələrini əmələ gətirdikləri kimi və mədəaltı vəzidə insulin istehsal edən hüceyrələrdə olduğu kimi çoxhüceyrəli orqanizmlərdə də çox hüceyrə tipləri bölünəndə qız hüceyrələr valideyin hüceyrəyə çox oxşayırlar. Əksinə, sütun hüceyrələr və differensasiya etməmiş başqa hüceyrələr çox tipdə differensasiya etmiş nəsil hüceyrələrini yaradırlar, bu hüceyrələr çox zaman elə bölünürlər ki, yaranan iki qız hüceyrə fərqli olur. Belə **asimmetrik hüceyrə bölünməsi** sütun hüceyrələrə xarakterikdir və orqanizmdə müxtəlif hüceyrə tiplərinin yaranması üçün kritik əhəmiyyətlidir (bax Fəsil 21). Çox zaman, qız hüceyrələrdən biri öz valideyin hüceyrəsinə oxşayaraq differensasiya etmir və özünün çoxsaylı müxtəlif tipli differensasiya etmiş hüceyrə yaratmaq qabliyyətini saxlayır. Digər qız hüceyrə dəfələrlə bölünür və onun hər bir yeni qız hüceyrəsi spesifik hüceyrə tipinə differensasiya edir.

Schmidtea mediterranea planarisi özünün tam fərdi regenerasiya etmək ─ kəsilməklə əmələ gəlmiş kiçik bədən hissəsindən normal başlı fərdi yaratmaq qabliyyətinə görə məşhurdur (bax Şəkil 1-22e). Planari normal həyat dövrəsində itirilmiş hüceyrələri bərpa edən sütun hüceyrələrinə malikdir. Hissələrə kəsilmiş heyvanın hissələrində bir neçə hüceyrə bölünməsindən sonra onlar regenerasiya üçün lazım olan istənilən hüceyrə tipini yaradacaqlar. Bu sütun hüceyrələr, müxtəlif hüceyrə tiplərindən qurulmuş baş və quyruğun necə əmələ gəldiyini aşkar etdmək üçün potensial eksperimental sistem rolunu oynadılar (bax Fəsil 16 və 21). Bədənin müxtəlif hissələrində spesifik tip hüceyrələri yaratmaq üçün sütun hüceyrələrinə təlimat verən hormonlar məməlilərdə, o cümlədən insanlarda inkişaf zamanı istifadə olunan hormonlara oxşardı (bax Fəsil 16), beləliklə planarinin regenerasiyasının gələcək tədqiqatları alimləri insanın əl və ya göz kimi bədən hissələrinin necə regenerasiya oluna bilməsi barədə məlumatlandıra bilər.

Onurğasızlar, Balıq, Siçan və Başqa Orqanizmlər İnsan İnkişafının Öyrənilməsində və Xəstəliklərin Öyrənilməsində Eksperimental Sistemlər Kimi İstifadə Olunur

Ana bətnindən kənarda inkişaf edən, böyük-hüceyrəli embrionlara malik olan orqanizmlər (məsələn, qurbağalar, dəniz kirpiləri, balıqlar və toyuqlar), hüceyrələrin müqəddaratının izlənilməsində, onların müxtəlif toxumaları yaratdıqlarına görə və biokimyəvi tədqiqatlar üçün ekstraktların rahat alınmasına görə son dərəcə səmərəlidirlər. Məsələn, bütün eukariotlarda hüceyrə bölünməsini tənzimləyən əsas həlledici zülal ilk dəfə dəniz kirpisinin və qurbağaların embrionlarını öyrənərkən aşkar edilmişdir və sonralar bu embrionların ekstraktlarından ayrılıb təmizlənmişdir (bax Fəsil 19).

İxtisaslaşmış toxumalarda hüceyrələrin öyrənilməsində bitki və heyvan model sistemlərindən istifadə edilir. Məsələn, sinir hüceyrələrini və əzələ hüceyrələrini, ənənəvi olaraq məməlilərin orqanizmlərində və ya xüsusən böyük hüceyrəsi olan canlılarda, məsələn kalmarların və dəniz dovşanının çox böyük sinir hüceyrələrində və ya quşların uçma əzələlərinin hüceyrələri kimi əldə oluna bilən hüceyrələrdə öyrənilmişdir. Daha son zamanlarda, sinir və əzələnin inkişafı, bu orqanların formalaşmasında və funksiyasında mutantları asanlıqla alına bilən meyvə milçəyində (*Drosophila melanogaster*), həlqəvi qurdlarda (*Caenorhabditis elegans*), zebra balıqlarda (*Danio rerio*) geniş şəkildə öyrənilmişdir (bax Şəkil 1-22).

Siçan başqa eksperimental orqanizmlər üzərində çox böyük üstünliyə malikdir: onlar, çox güclü genetik yanaşmaların mümkünliyinə görə istənilən başa orqanizmlərdən insana daha çox yaxındırlar. Siçanlar və insanlar oxşar canlı quruluşlarını minilliklər boyu bölüşürlər, oxşar immun sisteminə malikdirlər, və hər ikisi çox sayda eyni patogenlərlə yoluxurlar. Qeyd olunduğu kimi, hər iki orqanizim təxminən eyni sayda genə malikdir və təxminən siçanın 99 faiz zülal kodlaşıran genlərinin homoloqu insanda və ya əksinə, insanınkı siçanda vardır.

Tədqiqatçılar son illərdə yaradılmış rekombinant DNT texnologiyasından istifadə edərək, kodlaşdırdığı zülalları inaktivasiya edən və ya onların istehsalını artıran mutasiyalara malik olan xüsusi genləri yarada və onların kodlaşdırdığı zülallardan yan keçə bilirlər. Belə spesifik mutasiyalı genlər qurdların, milçəklərin, qurbağaların, dəniz kirpilərinin, toyuqların, siçanın, çoxsaylı müxtəlif bitkilərin və bu mutasiyanın təsirinin tutulmasına imkan verən başqa orqanizmlərin rüşeyiminə keçirilə bilir. Bu yanaşma Fəsil 6-da təsvir edilmiş Cas9 eksperimental sistemdən istifadə edərək insanın genetik xəstəliklərinin heyvan versiyasını yaratmaq üçün geniş şəkildə istifadə edilir. Buna bir nümunə kimi, autizim spektrum pozuntusu olan insanlarda çox zaman xüsusi zülal-kodlaşdıran genində mutasiya olur. Bu mutasiyanın rolunu

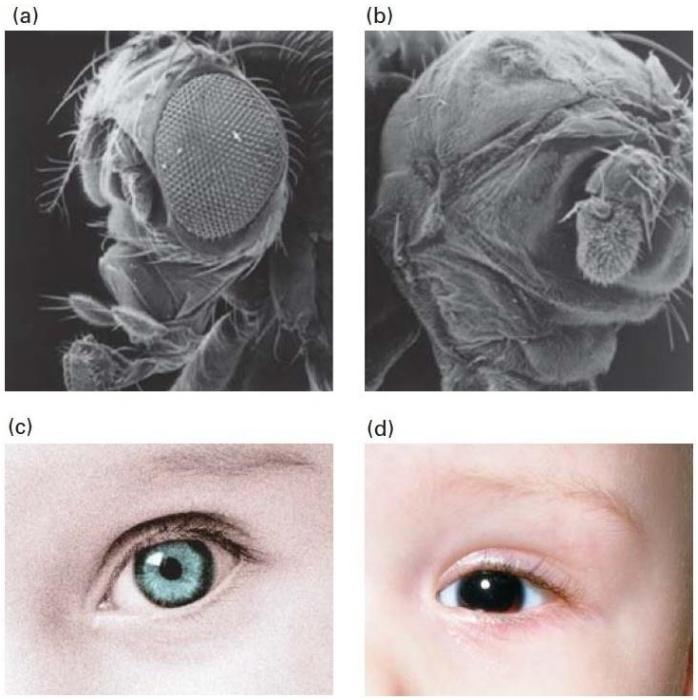
anlamaq üçün bu genlər siçanda fəalsızlaşdırılmışdır və çox hallarda insan xəstəliklərinin simptomlarını, o cümlədən həddən artıq təkrarlanan özünə-qulluq nümayiş etdirmişdir, bu da göstərir ki, insan geninin mutasiyası həqiqətən də pozuntunun əmələ gəlməsinə səbəb olmuşdur. Keçən bir ilin müddətində oxşar metodlar hədəf genlərin fəalsızlaşdırıldığı meymunları yaratmaq üçün istifadə edilmişdir. Bu cürə yanaşmalar öyrənmə və yaddaş kimi yüksək səviyyəli beyin tapşırıqlarında iştirak edən spesifik genlərin aşkar olunmasında və ya yalnız insanları və qeyri insan primatları yoluxduran virusların öyrənilməsi üçün faydalı ola bilir. İnsan xəstəliklərinin heyvan modeli hazır olduqda, xəstəliyin yaranmasına səbəb olan molekulyar qüsurlar üzrə sonrakı tədqiqatlar həyata keçirilə və yeni müalicə üsulları sınaqdan keçirilə bilər, beləliklədə xəstə insanların sınaqdan keçirilməmiş müalicə metodlarına məruz qalması azalar.

Genetik Xəstəliklər Hüceyrə Funksiyasının Əhəmiyyətli Aspektlərini İzah Edir

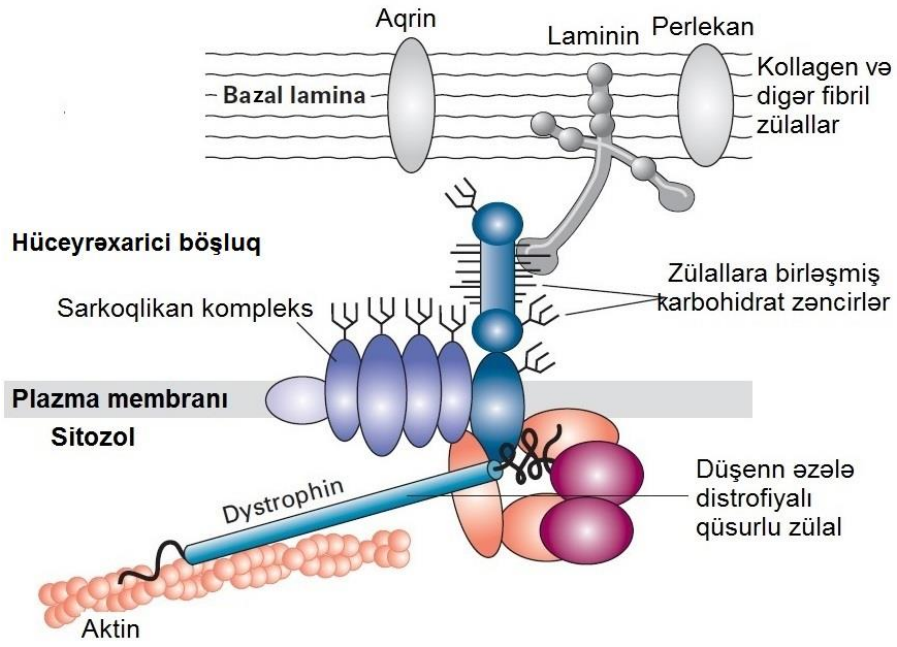
Çoxsaylı genetik xəstəliklər vahid bir zülalda baş verən mutasiya ilə əmələ gəlir; bu xəstəliklərə düçar olan insanlar üzərində aparılan tədqiqatlar bu zülalların normal funksiyalarına işıq salır. Bir misal kimi, ümumilikdə əzələ distrofiyası kimi adlandırılan, irsi əzələ-məsrəfi (itirilməsi) xəstəliklərinin ən geniş yayılmış ümumi tipi Duşenne əzələ distrofiyasına (DMD) nəzər yetirək. DMD X-xromosomla-əlaqəli pozuntudur, hər 33000 oğlandan birində rast gəlinir, bu da ürək və ya nəfəs yollarının çatışmazlıqları ilə nəticələnir, adətən yeniyetməliyin sonunda və 20+ yaşın erkən dövründə ölurlər. Bu xəstəliyin molekulyar əsaslarınımn başa düşülməsində ilk dəlil DMD xəstəliyi daşıyan insanların distrofin adlanan zülalı kodlaşdıran genində mutasiyanı daşıdığı aşkar olunması ilə əldə olunmuşdur. Fəsil 17-də ətraflı verildiyi kimi, həddən artıq böyük olan bu zülal sitozol skelet sisteminin bir hissəsi olan aktin filamentlərə (bax Şəkil 1-13) və sarkoqlikan kompleks adlanan mürəkkəb əzələ plazma membranı zülallarına (Şəkil 1-31) birləşən sitoplazmatik adaptor zülalıdır. Nəticədə əmələ gəlmiş çoxzülallı nəhəng toplantı (assemblage), distrofin qlikozülal kompleksi (DGC) əzələ və digər tip hüceyrələrdə hüceyrəxarici matrisa zülalı laminini sitoskeletlə əlaqələndirir. Distrofində, digər DGC komponentlərdə və ya laminində mutasiyalar, əzələ hüceyrələrinin daxili və xarici arasında DGC-vasitəçiliyi ilə yaranan əlaqəni qırır və əzələnin zəifləməsinə və tədricən ölümün baş verməsinə səbəb olur. Tam distrofin qlükozülal kompleksinin identifikasiyasında ilk addım, normal fərdlərin və Duşenne əzələ distrofiyası xəstələrinin DNT-sindən istifadə etməklə distrofin-kodlaşdıran genin klonlaşdırılması oldu.

Növbəti Fəsillər, Hüceyrənin Quruluşu və Funksiyası Haqqında Bizim Necə Bilməyimizi və Nəyi Bilməyimizi İzah Edən Daha Çox Eksperimental Verilənləri Təqdim Edir

Bu kitabın növbəti fəsillərində biz hüceyrə proseslərini daha dərin təfsilatı ilə izah edirik. Biz, (Fəsil 2) hüceyrənin quruluş bloklarının kimyəvi təbiətinin və sonrakı fəsillərdə müzakirə olunan makromolekulyar prosesləri anlamaq üçün tələb olunan əsas kimyəvi proseslərin müzakirəsi ilə başlayırıq. Sonra biz zülalların quruluşunun və funksiyasının müzakirəsinə (Fəsil 3) keçirik. Fəsil 4-də hüceyrələrin kulturaya keçirilməsi, onların fraksiyalara ayrılması və xüsusi zülalların hüceyrə daxilində quruluşunun öyrənilməsi və vizuallaşdırılması itiqamətində bioloqların istifadə etdiyi çoxsaylı metodları müzakirə edir. Fəsil 5 DNT-nin necə replikasiya etdiyini, DNT seqmentlərinin necə RNT-yə köçürüldüyünü və zülalların ribosomlarda necə sintez olunduğunu izah edir. Fəsil 6, genlərin, ekspressiyasının və zülalların funksiyasının öyrənilməsində tətbiq olunan çoxsaylı müxtəlif metodların izahına həsr olunub. Biomembranların quruluşu Fəsil 7-nin mövzusudur. Gen və xromosomun quruluşu və gen-ekspressiyasının tənzimlənməsi 8, 9 və 10-cu Fəsillərdə verilmişdir. İonların və kiçik molekulların membrandan keçərək daşınması 11-ci fəsilin mövzusudur, Fəsil 12 hüceyrə energetikasını və hüceyrədə mitoxondrilərin və xloroplastların funksiyasını müzakirə edir. Membran biogenezi, zülalların ifrazı və zülalların ötürülməsi – zülalların düzgün hüceyrədaxili məkana paylanması – 13 və 14-cü Fəsillərin mövzusudur.

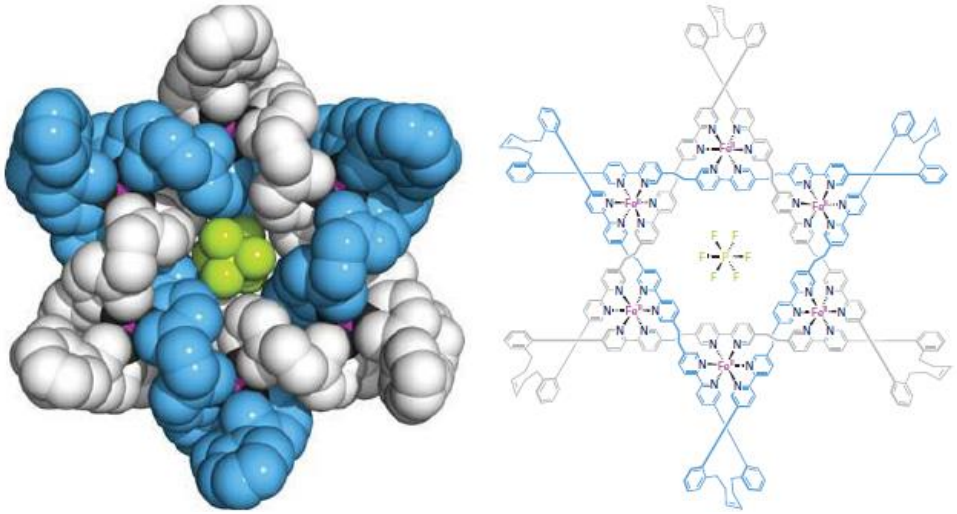


ŞƏKİL 1-30 Homoloji genlər çoxsaylı müxtəlif heyvanlarda gözün inkişafını tənzimləyir. (a) Meyvə milçəyinin çox böyük mürəkkəb gözlərinin inkişafı *eyeless* adlanan (mutant fenotip üçün adlandırılmışdır) geni tələb edir. (b) *eyeless* genin inaktivasiya olunduğu mutantlarda göz olmur. (c) İnsanın normal gözü, *eyeless* genin homoloqu olan *Pax6* genini tələb edir. (d) Adekvat *Pax6* gen funksiyasına malik olmayan insanların gözündə qüzehli qişası olmayan *aniridia* adlanan genetik xəstəlik olur. *Pax6* və *eyeless* genləri bir-birinə çox yaxın olan transkripsiya faktorlarını kodlaşdırırlar ki, onlar da başqa genlərin fəaliyyətini tənzimləyirlər və eyni əcdad gendən törəyib ayrılmışlar. [(a) və (b) hissələri nəzakətlə Andreas Hefti tərəfindən, Interdepartmental Electron Microscopy (IEM) Biocenter of the University of Basel. (c) hissəsi Simon Fraser/Science Source. (d) hissəsi Medican/Alamy-dən götürülmüşdür.]



ŞƏKİL 1-31 Distrofin qlikozülal kompleksi (DGC) skelet əzələsi hüceyrələridir. Qüsurlu olan Duşenne əzələ distrofiyasını əmələ gətirən distrofin zülalı sitoskeleti plazma membranın multizülal kompleksi sarkoqlikana bağlayır. Kompleksdə olan başqa zülallar bazal laminanın komponentlərinə, məsələn, lamininə birləşirlər, laminin isə öz növbəsində, bazal laminaya güc və möhkəmlik verən kollagen liflərə birləşir. Beləliklə, distrofin, əzələ hüceyrəsini və onun daxili sitoskeletinu ətrafdakı bazal lamina ilə əlaqələndirən zülallar qrupunun əhəmiyyətli nümayəndəsidir. Bax D.E. Michele and K.P. Campbell, 2003, *J.Biol.Chem*. **278**:15457.

Fəsil 15 və 16, hüceyrələr tərəfindən əlaqə yaratmaq, öz fəaliyyətlərini tənzimləmək üçün istifadə etdikləri çoxsaylı müxtəlif tip siqnalları və siqnal reseptorlarını müzakirə edir. Sitoskelet və hüceyrənin hərəkəti Fəsil 17 və 18-də müzakirə olunur. Fəsil 19 hüceyrə tsiklinin və hüceyrə bölünməsinin necə tənzimləndiyini müzakirə edir. Hüceyrələr arasında və hüceyrələrlə hüceyrxarici matrisa arasında toxumaların və orqanların yaranmasına imkan yaradan qarşılıqlı təsirlər Fəsil 20-də ətraflı verilir. Kitabın sonrakı fəsilləri, ixtisaslaşmış hüceyrələrin əhəmiyyətli tiplərini – sütun hüceyrələrini (Fəsil 21), sinir hüceyrələrini (Fəsil 22) və immun sisteminin hüceyrələrini (Fəsil 23) müzakirə edir. Fəsil 24 xərçəng xəstəliyini və hüceyrənin inkişafının və differensassiyasının mutasiyalarla dəyişilə bilən müxtəlif çoxsaylı yollarını müzakirə edir.



"David Ulduzu" katenan. Karbon, hidrogen və azotdan ibarət olan iki üçlü həlqələr, altı dəfə bir-birinə keçərək heksagram (altı-uclu ulduz) əmələ gətirmək üçün mürəkkəb kimyəvi sintetik yol vasitəsilə dəmir atomları ilə əmələ gətirdiyi körpü ilə birləşir. Kimyəvi quruluşu solda göstərilir, burada iki müstəqil həlqə mavi və narıncı rəngdədirlər. Sağ tərəfdə həlqənin birində mavi rəngdə və digər həlqədə isə açıq boz rənglə göstərilən karbon atomları ilə rentgen kristalloqrafiyası ilə təyin olunan üçölçülü quruluş; dəmirlər çəhrayı, azotlar isə bənövşəyi rəngdə göstərilir. Mərkəzdəki qeyri-kovalent rabitə ilə bağlanmış, mənfi yüklü fosforlu heksafluoriddir (abı və yaşıl). Bax D. A. Leigh, R. G. Pritchard, and A. J. Stephens, 2014, *Nature Chem.* **6**:978–982.

FƏSİL 2

Kimyəvi Əsaslar

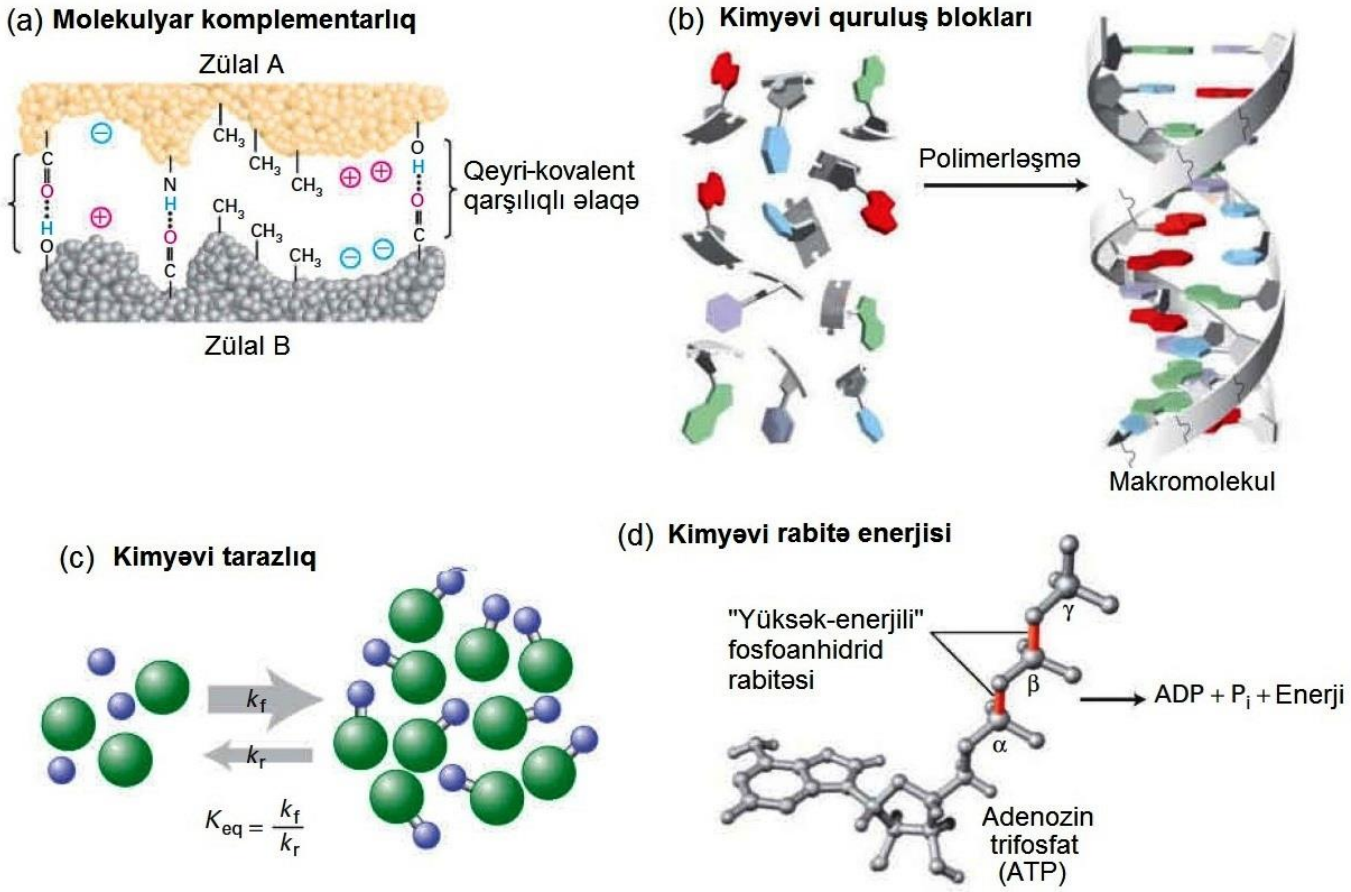
Hüceyrənin həyatı zaman və məkan daxilində güclü şəkildə minlərlə kimyəvi qarşılıqlı təsirlərdən, hüceyrənin genetik təlimatının təsiri altında və onu əhatə edən mühitin təsiri altında bir-birini koordinasiya edən reaksiyalardan asılıdır. Bu qarşılıqlı əlaqələri və reaksiyaları molekulyar səviyyədə anlamaqla, biz hüceyrə həyatı barədə fundamental suallara cavab verməyə başlaya bilərik: Hüceyrə öz ətraf mühitindən qida maddələrini və informasiyanı necə ayıra bilir? Hüceyrə qida maddələrində saxlanılan enerjini hərəkətdə və ya metabolizmdə olan işə necə çevirir? Hüceyrələr qida maddələrini hüceyrənin yaşaması üçün lazım olan hüceyrə komponentlərinə necə çevirirlər? Toxumaları formalaşdırmaq üçün hüceyrə özünü başqa hüceyrələrlə necə əlaqələndirir? Hüceyrələr kompleks şəkildə, səmərəli fəaliyyətdə olan orqanizmlərin inkişaf edib yaxşı yaşaması üçün bir-biri ilə necə əlaqə yaradırlar? *Molekulyar Hüceyrə Biologiyasının* əsas məqsədlərindən biri bu suallara və hüceyrənin, orqanizmlərin quruluşu və funksiyası barədə başqa suallara fərdi molekulların və ionların xüsusiyyətləri baxımından cavab verməkdir.

Məsələn, belə molekullardan biri olan, suyun xassəsi hüceyrənin təkamülünə, quruluşuna və funksiyasına nəzarət edir. Biologiyanı suyun xassəsinin həyatın kimyəvi əsaslarına necə nəzarət etiyini qiymətləndirmədən anlamaq mümkün deyil. Həyat ilk dəfə su mühütündə yaranmışdır. Su hüceyrələrin əksəriyyətində çəkinin 70-80 faizini təşkil etməklə bioloji sistemlərdə ən çox olan molekuldur. Bu su mühiti şəraitidir ki, canlı aləmin çəkisinin təxminən 7 faizi, hüceyrənin mexaniki sistemini və arxitekturasını təşkil edən böyük makromolekulların və makromolekulyar aqreqatların, yəni orqanizmlərin qalan bütün kütləsi tərkibində cəmlənmişlər. Kiçik molekullara amin turşuları (zülalların quruluduğu bloklar), nukleotidlər (DNT və RNT-nin quruluduğu bloklar), lipidlər (biomembranların quruluduğu bloklar) və şəkərlər (mürəkkəb karbohidratların quruluduğu bloklar) daxildirlər.

Hüceyrənin çox biomolekulları (məsələn, şəkərlər) asanlıqla suda həll olurlar; bu molekullara **hidrofil** (“suyu sevən”) molekullar deyilir. Amma başqa biomolekullar (məsələn, xolesterin) yağlıdırlar, piy sevən maddələr sudan qaçırlar; bunlara **hidrofob** (“sudan qorxan”) molekullar deyirlər. Bir sıra başqa biomolekullar (məsələn, fosfolipidlər) həm hidrofob, həm də hidrofil rayonlara malik olurlar; bu molekullara **amfipatik** (“hər ikisini sevən”) deyilir. Fosfolipidlər hüceyrələrin və onların daxili orqanellalarını əhatə edən dəyişkən membranların qurulmasında istifadə olunur. Hüceyrələrin, toxumaların və orqanizmlərin rəvan fəaliyyəti, ən kiçikdən böyügə qədər bütün bu molekullardan asılıdır.. Həqiqətən də, sadə bir protonun (H^+) kimyası çox nəhəng DNT molekulunda (insan xromosomu 1-də DNT molekulunun kütləsi 8.6×10^{10} dəfə protondan böyükdür) olduğu kimi, insan hüceyrəsinin sağ qalması üçün əhəmiyyətli ola bilir. Bütün bu böyük və kişik molekulların su ilə və bir-biri ilə kimyəvi qarşılıqlı təsiri canlı aləmin təbiətini müəyyən edir.

QISA ICMAL

2.1 Kovalent Rabitələr və Qeyri-kovalent Qarşılıqlı Təsir
2.2 Hüceyrənin Kimyəvi Quruluş Blokları
2.3 Kimyəvi Reaksiyalar və Kimyəvi Tarazlıq
2.4 Biokimyəvi Energetik

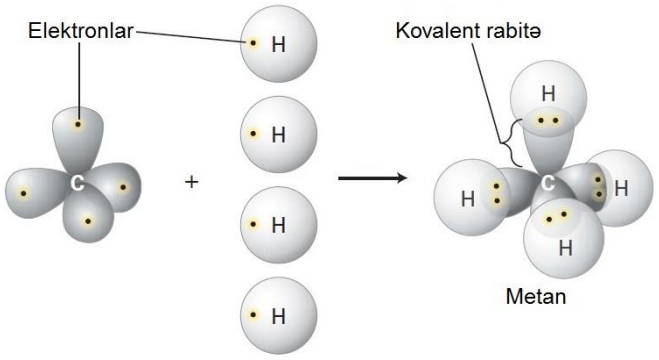


ŞƏKİL 2-1 Həyatın kimyası: dörd əsas konsepsiya. (a) Molekulyar komplementarlıq komplementar formasına və kimyəvi xassəsinə görə iki zülalın sıx birləşmiş kompleksini əmələ gətirmək üçün bir yerə gəldiyi kimi biomolekulyar qarşılıqlı təsirin əsasında durur. (b) Kiçik molekullar böyük quruluşların tərkib blokları rolunu oynayırlar. Məsələn, informasiya daşıyan makromolekul DNT-ni yaratmaq üçün dörd nukleotid quruluş blokları uzun sapda (polimerdə) kovalent rabitələrlə birləşirlər və sonra ikiqat zənciri əmələ gətirmək üçün bir-birinin ətrafında burularlar. (c) Kimyəvi reaksiyalar geriyə dönəndirlər və başlanğıc reagentlər (*solda*) və reaksiyanın məhsulları (*sağda*) arasında kimyəvi paylanma düzünə (k_f, yuxarı ox) və əksinə, geriyə (k_r, aşağı ox) reaksiyaların sürətinin sabitindən asılıdır. Bu K_{eq}-lərin nisbəti uyğun miqdarda məhsulların və reaksiyanın tarazlıq anında yaranacaq reaksiya məhsullarının informativ miqdarını göstərir. (d) Çox hallarda, hüceyrədə kimyəvi reaksiualar üçün enerji mənbəyi ATP-nin hidrolizidir. Bu enerji ATP molekulunda (*qırmızı*) fosfoanhidrid rabitələrlə birləşmiş β və γ fosfatların su molekulunun əlavə olunması ilə qırılması zaman ADP və Pi formalaşması ilə ayrılır.

Xoşbəxtlikdən baxmayaraq ki, çox sayda müxtəlif biomolekullar funksional hüceyrəni və orqanizmi yaratmaq üçün çoxsaylı reaksiyalarla və kompleks yollarla qarşılıqlı təsirdə olurlar, hüceyrə proseslərini molekulyar səviyyədə anlamaq üçün nisbətən az sayda kimyəvi prinsiplər lazımdır (Şəkil 2-1). Bu fəsildə biz belə əsas prinsipləri nəzərdən keçiririk, bunlardan bəzilərini siz artıq çox yaxşı bilirsiz. Biz atomların molekullar daxilində birləşdiyi kovalent rabitələrlə, həmçinin molekul daxilində və molekullar arasında atomların qruplarını stabilləşdirən qeyri-kovalent qarşılıqlı əlaqələrlə başlayırıq. Sonra biz makromolekulların və makromolekulyar aqreqatların əsas kimyəvi quruluş bloklarını nəzərdən keçiririk. Bioloji sistemlərə daha münasib olan kimyəvi bərabərliyin bu aspektlərini nəzərdən keçirdikdən sonra biz fəsili biokimyəvi energetikanın əsas prinsipləri ilə, o cümlədən hüceyrə metabolizmində enerjinin tutulması və ötürülməsində ATP-nin (adenozin trifosfatın) mərkəzi rolu ilə başa çatdırırıq.

2.1 Kovalent Rabitələr və Qeyri-Kovalent Qarşılıqlı Təsirlər

Atomlar arasında güclü və zəif cazibə qüvvəsi fərdi molekulların bir yerdə olmasını təmin edən "yapışqandır" və müxtəlif molekullar arasında qarşılıqlı təsirə imkan yaradır. İki atom bir cüt elektronu bölüşərkən əmələ gələn əlaqə, atomları bir yerdə saxlayan çox güclü qüvvə - **kovalent rabitədir**. Çoxsaylı elektron cütlərini bölüşmək çoxsaylı kovalent əlaqələrlə (məsələn, "ikiqat" və ya "üçqat" rabitələrlə) nəticələnir. **Qeyri-kovalent qarşılıqlı əlaqələrin** zəif cazibə qüvvələrinin təyin edilməsi zülallar, nuklein turşuları, karbohidratlar və lipidlər kimi biomolekulların xassələrinin və funksiyalarının təyini zamanı eyni dərəcədə vacibdir. Bu bölmədə, biz əvvəlcə kovalent rabitələrə baxırıq, sonra qeyri-kovalent qarşılıqlı əlaqələrin dörd əsas tiplərini: ion əlaqələrini, hidrogen əlaqələrini, van-der Vaals qarşılıqlı təsiri və hidrofob təsiri müzakirə edirik.



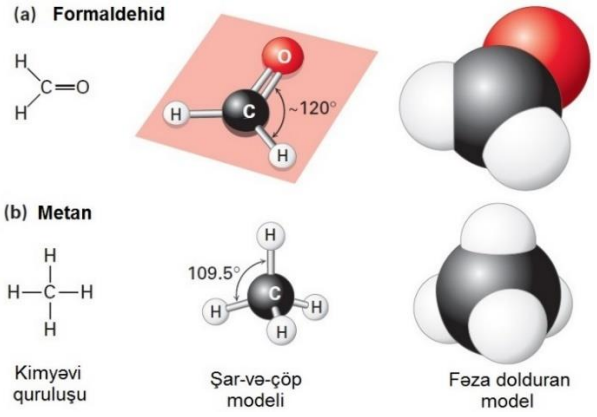
ŞƏKİL 2-2 Kovalent rabitələr elektronların ortaq istifadəsi ilə formalaşır. Kovalent rabitələr, molekulda atomları bir yerdə saxlayan güclü qüvvələr, atomlar ən kənarda olan elektron orbitindəki elektronlarını ortaq (bölüşərək) istifadə edəndə formalaşır. Hər bir atom kovalent rabitənin müəyyən sayını və geometriyasını formalaşdırır.

Atomun Elektron Quruluşu Onun Edə Biləcəyi Kovalent Rabitənin Geometriyasının Sayını Təyin Edir

Hidrogen, oksigen, karbon, azot, fosfor və kükürd bioloji molekullarda ən geniş yayılmış elementlərdir. Nadir hallarda təcrid olunmuş şəkildə mövcud olan bu atomlar, onların nüvəsini əhatə edən ən xarici elektron orbitindəki elektronlarını istifadə edərək asanlıqla kovalent əlaqə yaradırlar (Şəkil 2-2). Bir qayda olaraq, hər bir atom tipi atomların ölçüsünə və həm elektronların nüvə ətrafında paylanmasına görə, həm də ortaq istifadə oluna bilən elektronların sayına görə təyin edilən yaxşı müəyyən olunmuş geometriya ilə başqa atomlarla xarakterik sayda kovalent əlaqəni yaradırlar. Bəzi hallarda atomun stabil kovalent rabitələrinin sayı sabitləşdirilə bilər; məsələn: karbon həmişə dörd kovalent rabitə əmələ gətirir. Başqa hallarda müxtəlif sayda stabil kovalent rabitələrin olması mümkün olur; məsələn: kükürd iki, dörd və altı stabil kovalent rabitələri yarada bilir.

Bütün bioloji quruluş blokları dörd kovalent rabitə əmələ gətirən karbon atomları ətrafında təşkil olunmuşdur. Bu üzvi biomolekullarda adətən hər bir karbon üç və ya dörd başqa atomla birləşir. (Karbon həmçinin, iki karbon-oksigen ikiqat rabitəsinə (O=C=O) malik olan karbon-iki-oksidin, CO_2, xətti molekulu kimi iki başqa atomla da birləşə bilir, amma, karbonun bu cür rabitə düzülüşü bioloji quruluş bloklarında tapılmamışdır.) Şəkil 2-3a-da formaldehid üçün göstərildiyi kimi, karbon üç başqa atomla birləşə bilir, hamısı da eyni müstəvidə. Karbon atomu iki atomla iki tək rabitəni əmələ gətirir və üçüncü atomla tək ikiqat rabitə ilə (iki ortaq elektron cütü) birləşir. Başqa məcburiyyətlər olmadıqda, bir rabitə ilə birləşmiş atomlar asanlıqla birləşmə oxu ətrafında sərbəst fırlana bilirlər, halbuki, ikiqat rabitə ilə birləşənlər bunu edə bilmirlər. İkiqat rabitə ilə yaranmış sərt müstəvilik fosfolipidlər, zülallar və nuklein turşuları kimi biomolekulların forması və elastikliyi üçün çox böyük əhəmiyyət kəsb edir.

Karbon üç deyil, daha çox dörd atomla birləşir. Metanla (CH_4) təsvir olunduğu kimi, karbon dörd başqa atomla birləşmişdir. İstənilən iki birləşmə arasındakı bucaq 109.5°-dir və birləşmiş atomların vəziyyəti tetrahedronun dörd nöqtəsini təyin edir (Şəkil 2-3b). Bu geometriya çoxsaylı biomolekulların quruluşunu müəyyən edir. Karbon atomu (və ya başqası) dörd müxtəlif (oxşar olmayan) atomla və ya qruplarla müstəvi olmayan konfiqurasiyada birləşmişsə asimmetrik adlandırılır. Rabitələrin **assimmetrik karbon atomları** ilə formalaşmış tetrahedral orientasiyası iki müxtəlif yolla üçölçülü fəzada təşkil olunmuş və bir-birinin güzgüdəki əksi olan molekulları yaratmışdır, bu xüsusiyyət xirallıq adlanır (Yunan sözü "cheir" - əl mənasını verir) (Şəkil 2-4). Belə molekullara *optik izomerlər* və ya **stereoizomerlər** deyilir. Hüceyrələrdə çox molekullar ən azı bir *xiral karbon* atomları adlandırılan asimmetrik karbon atomuna malik olurlar. Adətən molekulların müxtəlif stereoizomerləri tamamilə fərqli bioloji fəaliyyətə malik olurlar, çünki onların **quruluşu** daxilində atomların düzülüşü və beləliklə də onların digər molekullarla qarşılıqlı təsiri fərqlənir.



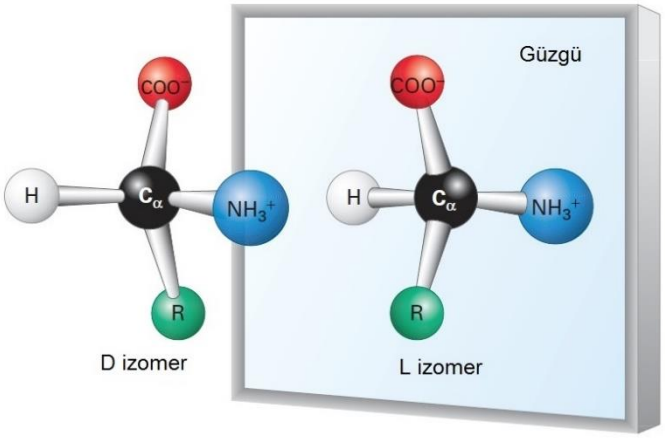
ŞƏKİL 2-3 Karbon üç və ya dörd müxtəlif atomlarla kovalent əlaqədə olanda rabitələrin geometriyası. (a) Karbon atomu formaldehiddəki (CH_2O) kimi üç müxtəlif atomla birləşə bilir. Belə olan halda, elektronların kabonla birləşməsi iki vahid rabitədə və bir ikiqat rabitədə iştirak edir və hamısı eyni səthdə də (və ya müstəvidə) yerləşir. Adətən rabitə oxu ətrafında asanlıqla fırlana bilən bir rabitə ilə birləşmiş atomlardan fərqli olaraq ikiqat rabitə ilə birləşənlər fırlana bilmirlər. (b) Karbon atomu metanda olduğu kimi (CH_4), dörd bir rabitəli əlaqə yaradırsa birləşmiş atomlar (indiki halda hamısı H) fəzada tetrahedron formada yönəlmişlər. Sol tərəfdə sonrakı təmsil olunanlar molekulların atom tərkibini və birləşmə modelini aydın şəkildə göstərir. Ortadakı kürə və çubuq modeli atomların və rabitələrin geometrik düzülüşünü gtöstərir, amma atomları və onların birləşməmiş elektronlarını təmsil edən kürələrin diametri rabitələrin uzunluğu ilə müqayisədə qeyri-real dərəcədə kiçikdir. Sağ tərəfdə, fəza dolduran modeldə elektron buludların ölçüsü üçölçülü quruluşu daha dəqiqliklə təmsil edir.

Bəzi dərmanlar kiçik molekulların stereoizomerlərinin qarışığından ibarətdirlər, bunlardan yalnız biri maraqlandıran bioloji fəallığa malikdir. Qarışıqların yerinə kimyəvi komponentlərin bir təmiz stereoizomerinin istifadə olunması daha güclü təsirə və az kənar effektlərə malik olan dərman kimi nəticələnə bilir. Məsələn, antidepressant dərman sitalopramın (Celexa) bir stereoizomeri başqa izomerlərindən 170 dəfə təsirlidir. Bəzi stereoizomrlər tamamilə başqa fəallıqlara malik olurlar. Darvon ağrı kəsicidir, amma onun stereoizomeri Novrad (geriyə istiqamətdə *Darvon* deməkdir) öskürək kəsicidir. Ketaminin bir stereoizomeri anestatik təsirə malik olduğu halda onun başqa stereoizomeri halyusinasiyanın yaranmasına səbəb olur. ■

CƏDVƏL 2-1 Çox Yayılmış Biomolekullarda Atomların Birləşmə Xassəsi

Atom və onun xarici elektronları	Kovalent rabitələrin sayı	Tipik Rabitə Geometriyası
H	1	H
O	2	O
S	2, 4 və ya 6	S
N	3 və ya 4	N
P	5	P
C	4	C

Biomolekullar üçün ümumi olan başqa atomlar tərəfindən formalaşmış kovalent rabitələrin tipik sayı Cədvəl 2-1-də göstərilmişdir. Hidrogen atomu yalnız bir kovalent rabitə yaradır. Oksigen atomu isə adətən iki kovalent rabitə yaradır, amma başqa qeyri-kovalent qarşılıqlı əlaqələri yaratmaq üşün iki əlavə elektron cütünə malikdir. Kükürd hidrogen sulfiddə (H_2S) iki kovalent rabitə yaradır, amma sulfat turşusunda və onun sulfat törəmələrində altı kovalent rabitəyə malik olur. Azotun və fosforun hər birinin bölüşmək üçün beş elektronu vardır. Azot atomu amonyakda üç kovalent rabitə əmələ gətirir; atomun kovalent rabitə əmələ gətirməyən ətrafındakı bir cüt elektronu qeyri-kovalent qarşılıqlı əlaqədə iştirak edir. Ammonium ionunda (NH_4^+), azot dörd kovalent rabitə yaradır və tetrahedral geometriyaya malik olur. Ümumiyyətlə, fosfor fosfat turşusunda (H_3PO_4) və onun nuklein turşularında özül yaradan fosfat törəmələrində olduğu kimi, beş kovalent rabitə yaradır. Zülallara kovalent birləşmiş fosfat qrupları çoxsaylı zülalların fəaliyyətinin tənzimlənməsində həlledici rolu oynayır və hüceyrə energetikasının əsas molekulu, ATP üç belə fosfat qrupuna malikdir (bax Bölmə 2-4). Tərkibinə daxil olduqları molekullara fərqli kimyəvi xüsusiyyətləri verən ümumi kovalent rabitələrin və funksional qrupların xülasəsi Cədvəl 2-2-də verilmişdir.



ŞƏKİL 2-4 Stereoizomerlər. Hüceyrədə çox molekullar ən azı bir asimmetrik karbon atomuna malikdirlər. Rabitələrin asimmetrik karbon atomları ilə formalaşmış tetrahedral yönümü üçölçülü fəzada iki müxtəlif yolla, güzgüdə bir-birinin əksi şəklində və ya bir-birinin stereoizomeri olan molekulları yaratmaqla təşkil oluna bilər. Burada göstərilən amin turşusunun qəbul olunmuş ümumi quruluşudur, onun mərkəzi asimmetrik karbon atomu və ona birləşmiş dörd qurup, o cümlədən bölmədə 2.2-də müzakirə olunan R qurup da daxil olmaqla. Amin turşuları bir-birinin güzgüdə əksi olan iki formada – L və D formalarda mövcud ola bilirlər. Baxmayaraq ki, belə stereoizomerlərin kimyəvi xassələri identikdirlər (eynidirlər), amma onların bioloji fəallıqları fərqlidir. Zülallarda anca L amin turşusu tapılmışdır.

Elektronlar Kovalent Rabitələrdə Bərabər və Qeyri-bərabər Bölüşə bilərlər

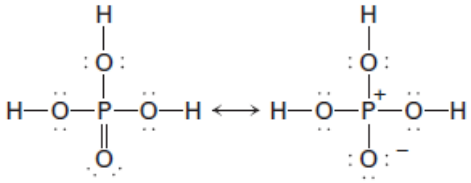
Atomların elektronları cəzb etmək imkanı dərəcəsi onların *elektromənfiliyi* (*elektroneqativliyi*) adlandırılır. Eyni və ya çox yaxın olan elektromənfiliyə malik olan atomlar arasındakı rabitədə yapışmış elektronlar, əksər karbon-karbon (C – C) tək əlaqə və karbon – hidrogen (C – H) tək əlaqələrində olduğu kimi, iki atom arasında xüsusən bərabər miqdarda paylanmışlar. Belə əlaqələr **qeyri-polyar** adlanır. Çoxsaylı molekullarda birləşmiş atomlar müxtəlif elektromənfiliyə malikdirlər, nəticədə elektromların qeyri-bərabər paylanması baş verir. Atomlar arasındakı belə birləşməyə **polyarlıq** deyilir.

Polyar birləşmənin bir sonluğu parsial mənfi yükə malikdir (δ^-), digər ucu isə parsial müsbət yükə malikdir (δ^+). Məsələn, O─H əlaqəsində oksigen atomunun hidrogenlə nisbətdə çox böyük elektromənfiliyi elektronların hidrogen atomlarına nisbətən oksigen atomu ətrafında daha çox fırlanmasının nəticəsidir. Beləliklə, O─H əlaqəsi elektrik **dipolluğuna** malik olur, müsbət yük bərabər, amma əks olan mənfi yükdən ayrılmışdır. O─H dipolunda oksigen atomundakı δ^- yükün miqdarı təxminən elektrondakının 25 faizini təşkil edir və H atomundakı əks δ^+ yükə ekvivalent olur. Dipol yüklərin bölünmə dərəcəsinin ümumi miqdarının və ya gücünün hesablanması **dipol momenti (anı)**, μ, adlanır, bu kimyəvi birləşmələr üçün hər atomun parsial yüklənməsinin və atomlar arasındakı məsafənin məhsuludur. Çoxsaylı dipollara malik olan molekullarda, bütovlükdə molekul üçün yük paylanmasının miqdarı qismən onun hər bir kimyəvi əlaqələrinin dipol anlarından və qismən molekulların geometriyasından (fərdi dipol anların nisbi yönəldilməsindən) aslıdır.

Misal üçün suya nəzər salaq (H_2O), onun iki O–H əlaqəsi var və beləliklə o iki əlaqənin dipol anına malikdir. Əgər su iki rabitənin O atomunda tam bərabər əks istiqamətlərə yönəldiyi xətti molekul olsaydı, molekulun hər bir ucunda yerləşən iki dipol tam bərabər gücə malik olardı amma, müxtəlif istiqamətlərə yönəlmiş olardı. Bu iki dipol an bir-birini ləğv edərdi və bütovlükdə molekulun dipol anı sıfır olmalı idi. Amma su V-şəkilli olduğundan və iki O–H əlaqəsinin hər ikisi oksigenə istiqamətlənmiş fərdi dipollara malik olduğundan su

molekulunun bir ucu (oksigen atomu olan uc) qismən neqativ yükə malik olur. Nəticədə, bütövlükdə molekul yaxşı müəyyən olunmuş dipol anına malik olan dipol olur (Şəkil 2-5). Bu dipol an və oksigenlə hidrogen atomlarının elektron xassəsi suyun başqa su molekulları ilə qeyri-kovalent elektrostatik qarşılıqlı əlaqə yaratmasına imkan verir. Bu qarşılıqlı əlaqələr hüceyrədə və orqanizmlərdə demək olar ki, bütün biokimyəvi qarşılıqlı əlaqələrdə əhəmiyyətli rol oynayır və biz bunu tezliklə görəcəyik.

Polyarlığın başqa bir nümunəsi, H_3PO_4-də O=P ikiqat əlaqəsidir. Aşağıda, sol tərəfdə H_3PO_4-ün göstərilən quruluşunda xətlər birqat və ikiqat rabitələri bildirir və birləşməmiş elektronlar qoşa nöqtələrlə göstərilmişdir:

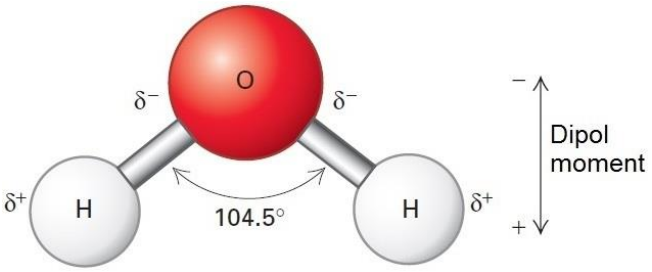


O=P ikiqat rabitənin polyarlığına görə H_3PO_4 həmçinin sağdakı quruluş şəkilində də göstərilə bilər, burada O=P ikiqat rabitənin elektronlarından biri O atomu ətrafında toplanaraq ona mənfi yük verir və P atomunu isə müsbət yüklü saxlayır. Bu yüklər qeyri-kovalent qarşılıqlı əlaqələr üçün əhəmiyyətlidir. Bu modellərin heç biri H_3PO_4-ün elektron vəziyyətini dəqiqliklə təsvir etmir. Əsil quruluş ikitərəfli oxlarla göstərildiyi kimi təsvir olunan bu iki model arasındakı aralıq və ya hibrid quruluş hesab oluna bilər. Belə aralıq quruluşlar *rezonans hibridlər* adlanır.

Kovalent Əlaqələr Qeyri-Kovalent Əlaqələrə Nisbətən Daha Möhkəm və Sabitdirlər

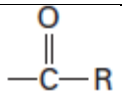
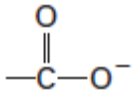
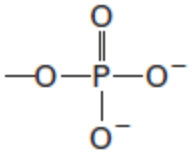
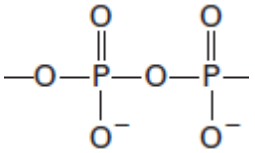
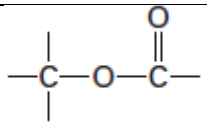
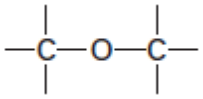
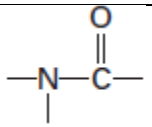
Kovalent rabitələr daha möhkəm hesab edilir, çünki onların qırılması üçün otaq temperaturunda (25ºC) və ya bədən temperaturunda (37 ºC) mümkün olan termal enerjidən daha çox enerji tələb olunur. Nəticədə, onlar bu temperaturda stabil olurlar. Məsələn, 25ºC-də termal enerji təxminən bir mola 0.6 kilokalori (kkal/mol) olur, halbuki etan molekulunda C–C əlaqələrini qırmaq üçün 140 dəfə çox enerji tələb olunur (Şəkil 2-6). Nəticədə, otaq temperaturunda (25ºC) hər 10^{12} etan mlekulundan biri və ya daha az miqdarı qırılaraq cüt olmayan birləşməmiş elektrona malik olan (radikal adlandırılan) bir cüt $\bullet CH_3$ molekulunu verə bilir.

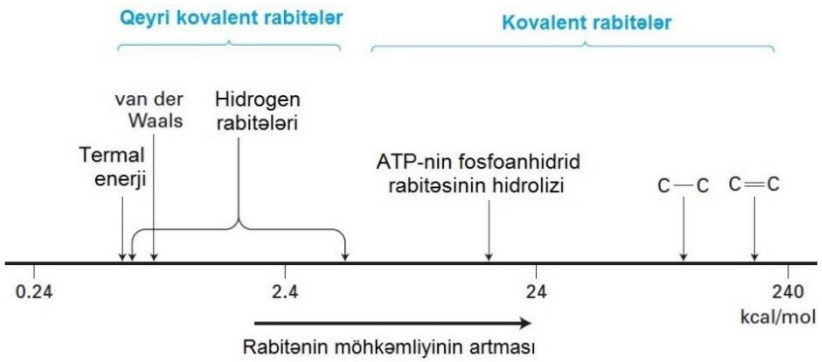
Bioloji molekullarda tək kovalent rabitə etandakı C–C əlaqələrində olduğu kimi yüksək enerjiyə malikdir. Çünki ikiqat rabitələrdə atomlar arasında daha çox elektronlar ortaq bölüşürlər və onları ayırmaq üçün birqat rabitəyə nisbətən daha çox enerji tələb edilir. Məsələn, Tək C–O əlaqələrini qırmaq üçün 84 kkal/mol tələb olunur amma, C=O ikiqat əlaqələrini qırmaq üçün 170 kkal/mol tələb olunir. Bioloji molekullar daxilində daha çox ümumi olan ikiqat rabitələr C=O, C=N, C=C və P=O-durlar.



ŞƏKİL 2-5 Su molekullarının dipol xassəsi. δ işarəsi natamam yüklənməni göstərir (elektronlara və ya protonlara nisbətən zəif yüklənmə). H və O-in elektronmənfiliyinin fərqinə görə sudakı hər bir polyar H–O əlaqəsi dipoldur. Əlaqələrin hər birində dipolların ölçüsü və istiqaməti molekulda yük paylanmasının miqdarını və əsil ölçüsünü və ya dipol anını təyin edir.

CƏDVƏL 2-2 Biomolekullardakı Ümumi Funksional Qruplar və Əlaqələr

Funksional Qruplar			
—OH Hidroksil (spirt)	 Asil (triasilqliserol)	 Karbonil (keton)	 Karboksil (karboksil turşusu)
—SH Sulfhidril (tiol)	—H_2 və ya —N^+H_3 Amino (aminlər)	 Fosfat (fosforlaşmış molekul)	 Pirofosfat (difosfat)
Əlaqələr			
 Mürəkkəb efir	 Sadə efir	 Amid	



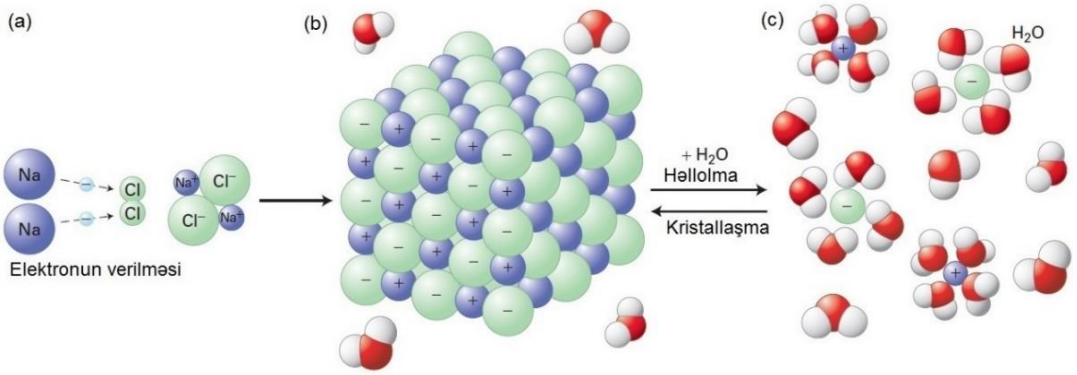
ŞƏKIL 2-6 Kovalent rabitələrin və qeyri-kovalent əlaqələrin nisbi enerjisi. Birləşmə enerjisi xüsusi tip əlaqələrin qırılması üçün tələb olunan enerjiyə deyilir. Burada göstərilənlər müxtəlif əlaqələrin qırılması üçün tələb olunan enerjinin loqarifmik miqyasda düzülüşüdür. Kovalent rabitələr, o cümlədən birqat (C–C) və ikiqat (C=C) karbon-karbon əlaqələri, qeyri-kovalent əlqələrə nisbətən 10 dəfədən artıq gücə malikdir. Sonuncu, normal otaq temperaturu şəraitində (25ºC) ətraf mühitin termal enerjisindən bir xeyli böyükdür. Çox bioloji proseslər ATP-də fosfoanhidrid əlaqənin hidrolizi zamanı ayrılan enerjiyə bağlanır.

Əksinə, qeyri-kovalent əlaqələrin qırılması üçün 1–5 kkal/mol, yəni kovalent rabitələrin qırılması üçün tələb olunduğundan daha çox az enerji tələb olunur (bax Şəkil 2-6). Həqiqətən də, qeyri kovalent qarşılıqlı əlaqələr otaq temperaturunda konstant şəkildə yaranmaq və qırılmaq üçün kifayət qədər zəifdir. Hərçənd ki, bu qarşılıqlı əlaqələr fizioloji temperaturda (25-37ºC) zəifdir və keçici mövcudluğa malik olurlar, amma çoxsaylı qeyri-kovalent qarşılıqlı əlaqələr bizim sonra görəcəyimiz kimi, böyük molekulların müxtəlif hissələri arasında və ya müxtəlif makromolekullar arasında yüksək stabilliyə malik olan spesifik birləşmələri yaratmaq üçün birlikdə təsir edə bilirlər. Zülal-zülal və zülal-nuklein turşuları arasında qarşılıqlı təsir qeyri-kovalent əlaqələr üçün yaxşı nümunədir. Biz aşağıda qeyri-kovalent əlaqələrin dörd əsas tipini nəzərdən keçiririk və sonra onların biomolekulların bir-biri ilə və başqa molekullarla birləşməsində rolunu göstəririk.

İon Əlaqələri Əks Yüklənmiş İonlar Arasında Cazibədir

İon qarşılıqlı əlaqələri müsbət yüklənmiş ionlar – kationlar və mənfi yüklənmiş ionlar – anionlar arasındakı cazibə nəticəsində yaranır. Məsələn, natrium xloriddə (NaCl) natrium atomu tərəfindən verilmiş əlaqə elektronları xlor atomlarına keçmişdir (Şəkil 2-7a). Kovalent əlaqələrdən fərqli olaraq, ion qarşılıqlı əlaqəsi ion ətrafında elektrostatik sahə olduğundan dəqiq və ya spesifik geometrik orientasiyaya malik deyildir – onun əks yükə olan cazibəsi bütün istiqamətlərdə birformalıdır (eynidir). Bərk (kristal halda) NaCl-da əks yüklənmiş ionlar alternativ formada çox sıx şəkildə bir yerdə yerləşirlər və yüksək nizamlı, duz kristalları üçün tipik quruluşu yaradırlar. (Şəkil 2-7b). İon əlaqələrinin qırmaq üçün tələb olunan enerji ionlar arasındakı məsəfədən və ionları əhatə edən mühitin elektrik xassəsindən asılıdır.

Kristal duz suda həll olarkən, ionlar bir-birindən ayrılır və su molekulu ilə qarşılıqlı təsir nəticəsində stabilləşirlər. Su məhlulunda, Na+, K+, Ca2+, Mg2+ və Cl kimi bioloji əhəmiyyət kəsb edən sadə ionlar hidratlaşırlar və mərkəzi ion və su dipolunun əks yüklənmiş ucları arasında ion qarşılıqlı təsirlə bir yerdə saxlanılan su molekullarından təşkil olunmuş stabil qabıqla əhatə olunurlar (Şəkil 2-7c). İon qarışıqlarının əksəriyyəti hidrasiya (suda həll olma) enerjisi – ionların sıx şəkildə su molekulları ilə birləşməsi zamanı ayrılan və su məhlulunu yayılan enerji – kristal quruluşu stabilləşdirən enerjidən böyük olduğundan suda asanlıqla həll olurlar. İonlar zülallarla birbaşa qarşılıqlı təsirdə olan zaman su *hidrasiya örtüyünün* bir hissəsi və ya hamısı ionlardan uzaqlaşdırılmalıdır. Məsələn, sinir keçiriciliyi zamanı ionlar hüceyrə membranının zülal məsamələrindən keçən zaman onların hidrasiya suyu tamamilə itirilir.



ŞƏKIL 2-7 Duzun (NaCl) kristal halda və su məhlulunda əks yüklənmiş ionlarının elektrostatik qarşılıqlı təsiri. (a) Kristal xörək duzunda natrium (Na^+) ionlarının hər biri bir elektron itirdiyindən müsbət yüklənmişdirlər, amma xlor atomları uyğun olaraq hər biri bir elektron qəbul etdiyindən mənfi yüklənmişdirlər (Cl^-),. (b) Bərk formada ion komponentləri səliqəli şəkildə düzülmüş formanı və ya müsbət və mənfi yüklənmiş ionlar bir-birini tarazladığı sıx şəkildə yerləşmiş ionların kristalını əmələ gətirirlər. (c) Kristal suda həll olarkən ionlar ayrılırlar və onların yükü bir-birinə yaxın yerləşmiş əks yüklənmiş ionlarla tarazlanmırlar, polyar su ilə qarşılıqlı təsir nəticəsində stabilləşirlər. Su molekulları və ionlar ion yükləri ilə suyun oksigen və hidrogen atomlarının qismən yükləri arasındakı elektrostatik qarşılıqlı təsir əsasında bir yerdə olurlar. Su məhlulunda bütün ionlar su molekullarından ibarət olan örtüklə əhatə olunurlar.

İki bir-birinə əks yüklənmiş ionlar, A^- və C^+ arasında qarşılıqlı təsirin nisbi gücü məhluldakı başqa ionların qatılığından asılı olur. Başqa ionların (məsələn, Na^+ və Cl^-) qatılığı yüksək olduqca A^- və C^+ -nin bu başqa ionlarla ion əlaqələri yaratmaq imkanları yüksək olur və beləliklə A^- və C^+ arasında qarşılıqlı əlaqəni qırmaq üçün daha az enerji tələb olunur. Nəticədə, bioloji molekulların məhlulunda duz qatılığının, məsələn NaCl artırılması ilə biomolekulları bir yerdə saxlayan ion qarşılıqlı əlaqələrin zəifləməsi və ya hətta qırılması baş verir. Bu prinsipdən qarşılıqlı təsirdə olan molekulların mürəkkəb qarışıqlarının, məsələn zülalların təmiz komponentlərinə ayrılmasında istifadə oluna bilər.

Hidrogen Rabitələri Yüksüz Molekulların Suda Həllolma Qabliyyətini Müəyyən Edən Qeyri-kovalent Əlaqələrdir

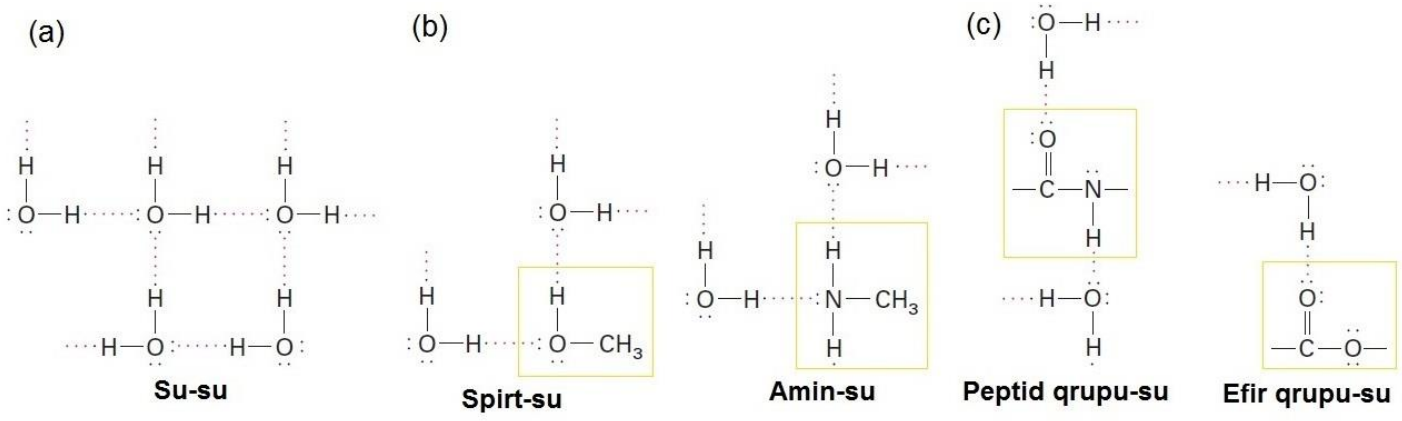
Hidrogen əlaqələri, su kimi dipol molekullarda qismən müsbət yüklənmiş hidrogen atomlarının eyni molekuldakı və ya digər molekullardakı atomların cütləşməmiş elektronları ilə yaratdığı qarşılıqlı təsirdir. Normal halda hidrogen atomu yalnız başqa bir atomla kovalent əlaqə yarada bilir. Amma, elektromənfi donor D atomuna kovalent birləşmiş hidrogen atomu, qarşılıqlı əlaqə üçün birləşməmiş əlavə elektron cütünə malik olan akseptor A atomu ilə hidrogen əlaqələri vasitəsi ilə əlavə zəif birləşmə əmələ gətirir:

$$D^{\delta-}\text{—}\ H^{\delta+} + A^{\delta-} \leftrightarrow D^{\delta-}\ \text{—}\ \underbrace{H^{\delta+} \cdots\cdots : A^{\delta-}}_{\textbf{Hidrogen əlaqəsi}}$$

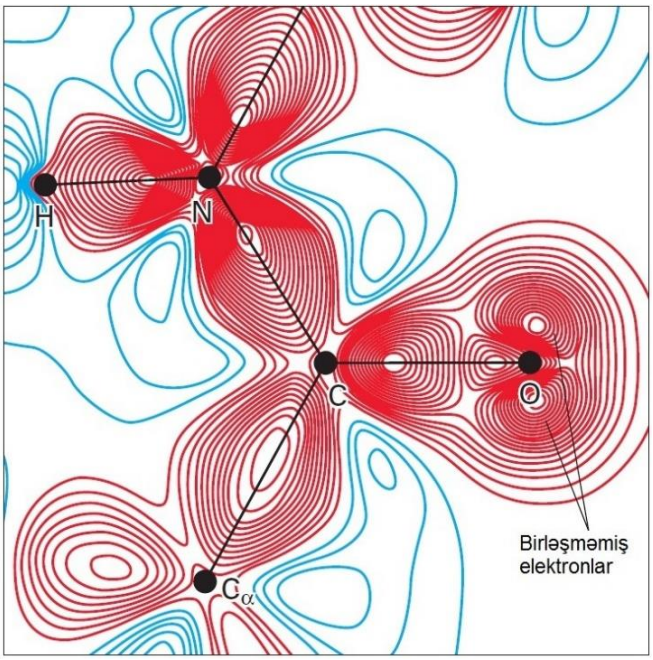
Kovalent D–H rabitəsinin uzunluğu, hidrogen əlaqəsi olmayan haldakı uzunluqdan nisbətən çoxdur, çünki akseptor hidrogeni donordan kənara "dartır". Bütün hidrogen əlaqələrinin əhəmiyyətli xüsusiyyəti onların istiqamətliliyidir. Daha möhkəm hidrogen əlaqələrində donur atom, hidrogen atomu, və akseptor atom hamısı bir xətt üzərində yerləşirlər. Qeyri-xətti hidrogen əlaqəsi xətti hidrogen əlaqəsindən zəifdir; yenə də çoxsaylı qeyri-xətti hidrogen əlaqələri çoxsaylı müxtəlif zülalların üçölçülü quruluşunun stabilləşməsinə kömək edirlər.

Atomlar arasındakı hidrogen əlaqələri həmin atomlar arasındakı kovalent əlaqələrdən uzun və zəif olurlar. Məsələn, yaxın yerləşmiş hidrogen əlaqəli su molekullarında hidrogen atomunun və oksigen atomunun nüvəsi arasındakı məsafə təxminən ~0.27 nm olub bir su molekulu daxilindəki kovalent O—H rabitəsindən iki dəfə uzundur. (Şəkil 2-8a). Su molekulları arasındakı hidrogen əlaqəsinin gücü (təxminən 5 kkal/mol) kovalent O–H rabitəsinə (təxminən 110 kkal/mol-dur) nisbətən çox zəifdir, hərçənd ki, o özü bioloji molekullardakı çoxsaylı başqa hidrogen əlaqələrinə nisbətən (1-2 kkal/mol) daha möhkəmdir. Su molekulları arasındakı geniş molekullararası hidrogen rabitəsi onun çoxsaylı əsas xüsusiyyətlərinin, o cümlədən qeyri-adi dərəcədə yüksək ərimə və qaynama nöqtələrini və onun çoxlu miqdarda başqa molekulları həll etmək qabliyyətini izah edir.

Yüklənməmiş maddələrin su mühitində həllolma qabliyyəti onların su molekulları ilə hidrogen rabitəsi əmələ gətirmə qabliyyətindən çox asılıdır. Məsələn, hidroksil qrupu (–OH) spirtdə ($–CH_2OH$), amin qrupu ($–NH_2$) isə aminlərdə ($–CH_2NH_2$) su ilə bir neçə hidrogen rabitəsi yarada bilirlər və bu maddələrin suda yüksək qatılıqda həll olmasına imkan verirlər (Şəkil 2-8b). Ümumiyyətlə, su ilə asanlıqla hidrogen əlaqəsi yarada bilən polyar əlaqəli molekullar və eləcə də suda dipolla qarşılıqlı əlaqədə ola bilən yüklənmiş molekullar və ionlar suda asanlıqla həll ola bilirlər, buna görə də onlar hidrofildirlər. Çox bioloji molekullar hidroksil və amin qurupları ilə yanaşı peptid və efir quruplarına da malikdirlər ki, bunlar karbonil oksigenindəki başqa sərbəst elektronlar vasitəsilə su ilə hidrogen əlaqələrini yaradırlar (Şəkil 2-8c). Rentgen-kristalloqrafiyasının kompüter analizləri ilə kombinasiyası atomun birləşməmiş ən kənar (qıraq) elektronlarının və eləcədə Şəkil 2-9-da təsvir olunmuş kovalent əlaqələrdəki elektronların paylanmasının dəqiq təsvirini verməyə imkan verir.



ŞƏKİL 2-8 Suyun özü ilə və başqa komponentlərlə əmələ gətirdiyi hidrogen rabitələri. Oksigen və ya azot atomunda hər bir birləşməmiş sərbəst xarici elektron cütü hidrogen atomunu hidrogen rabitəsi ilə birləşdirə bilir. Hidroksil və amin qurupları su ilə hidrogen əlaqələri yarada bilirlər. (a) Maye suda hər bir su molekulu bir neçə başqa molekullarla keçici hidrogen əlaqəsi yaradır və hidrogen əlaqəsi ilə birləşmiş molekulların dinamik şəbəkəsini əmələ gətirir. (b) Su spirtlə və aminlərlə də hidrogen əlaqəsi yarada bilir ki, bu da həmin komponentlərin yüksək həllolma qabliyyətini izah edir. (c) Çoxsaylı biomolekullarda mövcud olan peptid qrupları və efir qrupları adətən su ilə və ya digər molekullardakı polyar qruplarla hidrogen əlaqələrinin yaranmasında iştirak edirlər.

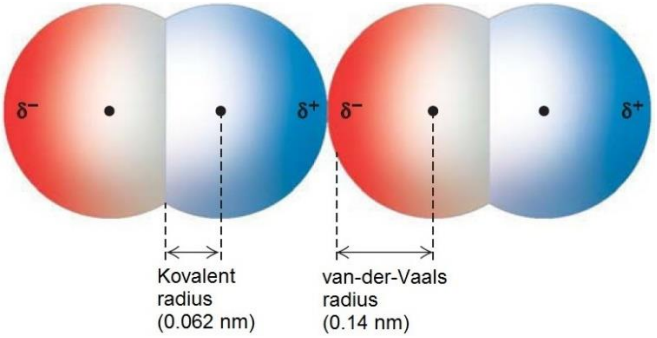


ŞƏKİL 2-9 Birləşən və xarici birləşməyən elektronların peptid quruplarında paylanması. Burada göstərilən krambin adlanan zülal daxilində iki amin turşusunu birləşdirən peptid əlaqəsidir. Quruluşu krambinin quruluşundan yüksək dərəcədə xarakterizə olunan iknci başqa zülal yoxdur. Qara xətlər atomlar arasındakı kovalent rabitəni göstərir. Qırmızı (mənfi) və mavi (müsbət) xətlər rentgen-kristalloqrafiya və kompüter metodu yolu ilə təyin edilmiş yük çevrəsini (contour) təsvir edir. Çevrə xətlərinin sayı çox olduqca yük də o qədər çox olur. Atomlar arasında qırmızı çevrə xətlərinin yüksək sıxlığı kovalent rabitəni (bölüşmüş elektron cütləri) təsvir edir. Oksigendən (O) ayrılan və kovalent əlaqəyə girməyən (qara xət) iki dəst qırmızı çevrə xətləri, hidrogen əlaqələrinin yaranmasında iştirak etməyə qabil olan oksigendəki iki cüt birləşməmiş elektronları göstərir. Hidrogenin (H) azota (N) birləşdiyi yerin yaxınlığında mavi çevrə xətlərinin yüksək sıxlığı qismən müsbət yükləri təsvir edir və göstərir ki, bu H hidrogen əlaqəsinin yaranmasında donor kimi fəaliyyət göstərir. [C. Jelish et al., 2000, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 97:3171 götürülmüşdür, hörmətlə M.M Teter tərəfindən.]

Van der Vaals Qarşılıqlı Əlaqələri Keçici Dipollar Tərəfindən Yaranmış Zəif Cazibə Əlaqələridir

İki atom bir-birinə çox yaxınlaşanda onlar, van der Vaals əlaqəsi adlandırılan qeyri-spesifik, zəif cazibə qüvvəsi yaradırlar. Bu qeyri-spesifik qarşılıqlı əlaqələr, istənilən atomda elektronların paylanmasında biranlıq təsadüfi tərəddüdün nəticəsidir, bu zaman elektronların qeyri-bərabər qısa müddətli (keçici) paylanması baş verir. Əgər iki qeyri-kovalent birləşmiş atomlar kifayət qədər yaxındırlarsa, o zaman bir atomun elektronları digər atomun elektronlarını həyacanlandıracaq. Belə həyacanlandırma ikinci atomda ani dipolun yaranmasına səbəb olur və iki dipol bir-birini zəif cəzb edəcəklər (Şəkil 2-10). Buna bənzər, bir molekuldakı polyar kovalent rabitə başqa molekuldakı əks istiqamətlənmiş dipolu cəzb edəcək.

Van der Vaals əlaqələri ya keçici (ani) induksiya olunmuş, ya da daimi elektrik dipollarını daxil etməklə bütün tip molekullarda, həm polyar həm də qeyri-polyar molekullarda meydana çıxır. Xüsusilə, van der Vaals əlaqələri heptan kimi (CH_3—$(CH_2)_5$—CH_3) bir-biri ilə hidrogen rabitəsi və ya ion əlaqələri yarada bilməyən qeyri-polyar molekullar arasındakı ilişməni həyata keçirirlər. Van der Vaals əlaqələrinin gücü məsafənin artması ilə kəskin sürətdə azalır; beləliklə, bu cür qeyri-kovalent əlaqələr yalnız atomların bir-biri ilə kifayət qədər yaxın olduğu hallarda formalaşa bilir. Amma atomlar bir-birinə həddən artıq yaxınlaşdıqda onların elektronlarının mənfi yükü itələmə qüvvəsi yaradır. İki atom arasındakı van der Vaals cazibə qüvvəsi onların iki elektron buludları arasındakı itələmə qüvvəsini tarazlayarkən atomlara van der Vaals əlaqəsindədir deyilir. Van der Vaals əlaqələrinin gücü təxminən 1 kkal/mol bərabərdir, bu tipik hidrogen rabitəsindən zəifdir, amma molekulun 25ºC-də orta termal enerjisindən yüngülcə çoxdur. Beləliklə, çoxsaylı van der Vaals əlaqələri, van der Vaals əlaqəsi başqa qeyri-kovalent əlaqələrlə birlikdə və ya hər ikisi molekul daxilində və molekullar arasında stabil cazibə qüvvəsini yaratmaq üçün tələb olunur.



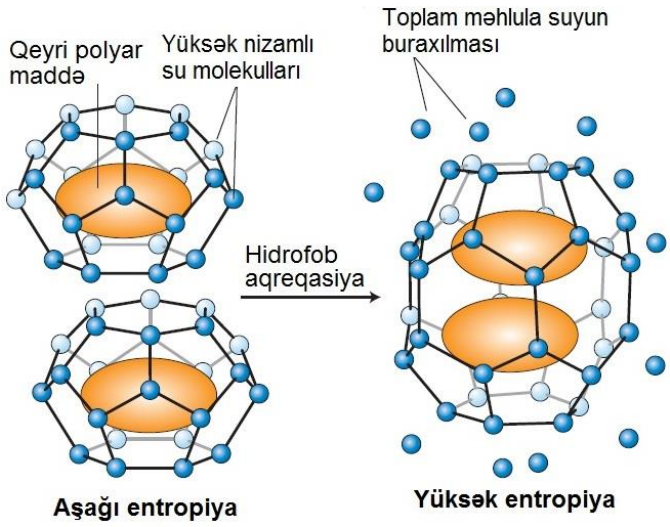
ŞƏKIL 2-10 Van der Vaals əlaqəsində olan iki oksigen atomu. Bu modeldə qırmızı mənfi yükü göstərir, mavi isə müsbət yükü göstərir. Bütün atomların elektron buludunda olan keçici (ani) dipolları van der Vaals əlaqəsi adlandırılan zəif cazibə qüvvəsini yaradırlar. Hər tip atom xarakterik van der Vaals radiusuna malikdir, bu zaman onun başqa atomla yaratdığı van der Vaals əlaqəsi optimal olur. Atomlar, onların xarici elektronlarının kovalent rabitədə bölüşmədən bir-birini örtməsi kimi kifayət qədər yaxın olduqları halda bir-birini itələdiyindən, van der Vaals radiusu atomu əhatə edən elektron buludunun ölçüsünün meyarıdır. Burada göstərilən kovalent radius O=O ikiqat rabitənindir; oksigenin bir rabitəli kovalent radiusu bir az uzundur.

Hidrofob Təsir Qeyri-Polyar Molekulların Bir-Birinə Birləşməsinə Səbəb Olur

Qeyri-polyar molekullarda yüklənmiş qruplar olmadığından onlar dipol ana (momentə) malik olmurlar və ya hidratlaşmırlar, onlar həll olmurlar və ya demək olar ki, suda həll olmamaq dərəcəsindədirlər; belə ki, onlar hidrofobdurlar. İki karbon atomu arasındakı və karbon atomu ilə hidrogen arasındakı kovalent rabitələr bioloji sistemlərdə çox rast gəlinən ümumi qeyri-polyar rabitələrdir. **Hidrokarbonlar** (**karbohidrogenlər**) yalnız karbon və hidrogendən təşkil olunmuş molekullar virtual olaraq suda həll olmurlar. Heyvan piylərini və bitki yağlarını

təşkil edən böyük triasilqliseridlər də (triqliseroidlər kimi də tanınırlar) həmçinin suda həll olmurlar. Bizim sonra görəcəyimiz kimi, bu molekulların əsas hissəsi karbohidrogen zəncirindən təşkil olunmuşdur. Suda çalpaladıqdan sonra triasilqliseridlər ayrıca faza yaradırlar. Buna yaxşı məlum olan bir nümunə kimi, bitki yağı və sirkəli salatda su tərkibli sirkədən bitki yağlarının ayrılmasını göstərmək olar.

Qeyri-polyar molekullar və ya molekulların qeyri-polyar hissəsi suda aqreqasiya etməyə meyillidirlər, bu hadisə **hidrofob effekt** adlandırılır. Su molekulları qeyri-polyar maddələrlə hidrogen rabitəsi əmələ gətirə bilmədiyindən onlar "qəfəslər" əmələ gətirməyə meyilli olurlar və ya qeyri-polyar molekul ətrafında nisbətən sərt hidrogen rabitəli pentaqonlar (beşguşələr) və ya heksaqonlar (altıguşələr) əmələ gətirirlər (Şəkil 2-11, *solda*). Bu vəziyyət energetik cəhətdən əlverişsizdir, çünki o su molekulları populyasiyasının entropiyasını və ya təsadüfiliyini azaldır. (Kimyəvi sistemlərdə entropiyanın rolu Bölmə 2.4-də müzakirə olunur.) Əgər su mühitində qeri-polyar molekullar özlərinin bir-birinə baxan hidrofob səthləri ilə aqreqasiya edirlərsə, o zaman su mühütinə məruz qalmış xalis hidrof səth azalır (Şəkil 2-11, *sağda*). Nəticədə, qeyri-polyar molekulların ətrafında qəfəs formalaşdırmaq üçün az su molekulları tələb olunur, entropiya aqreqasiya olunmamış vəziyyətə nisbətən artır və energetik cəhətdən daha əlverişli vəziyyət alınır. Müəyyən mənada, su qeyri-polyar molekulları aqreqatlar daxilinə sıxır. Hidrogen əlaqələrində olduğu kimi, cazibə qüvvəsin yaratmaq əvəzinə, hidrofob təsir qeyri-stabil vəziyyətin aradan qaldırılmasının, yəni fərdi qeyri-polyar molekullar ətrafında geniş su qəfəslərinin yaranmasının nəticəsidir.



ŞƏKIL 2-11 Hidrofob təsirlərin sxematik göstərilməsi. Məhlulda qeyri-polyar molekullar ətrafında formalaşmış su molekulları qəfəsi mühitdəki su molekullarına nisbətən daha nizamlı şəkildədir. Qeyri-polyar molekulların aqreqasiyası yüksək nizamlı qəfəsə daxil olan su molekullarının sayını azaldır, nəticədə, aqreqasiya olunmamış vəziyyətlə (*solda*) müqayisədə yüksək entropiya və energetik cəhətdən daha əlverişli vəziyyət alınır (*sağda*).

Qeyri-polyar molekullar van der Vaals qüvvələri vasitəsi ilə də assosasiya edə bilirlər, hərçənd ki, zəif hidrofob təsirin və van der Vaals qarşılıqlı əlaqənin son nəticəsi hidrofob molekulların su ilə deyil, bir-biri ilə qarşılıqlı təsirdə olmaları üçün çox güclü meyildirlər. Sadə desək, *oxşar oxşarı həll edir*. Polyar molekullar polyar həll edicidə, məsələn suda həll olurlar, qeyri-polyar molekullar isə qeyri-polyar həlledicidə, məsələn heksanda həll olurlar.

Çox yaxşı məlum olan bir hidrofob molekul xolesterindir (quruluşuna görə Bölmə 2.2-ə bax). Xolesterin, eləcə də triqliseroidlər və həmçinin başqa suda pis həll olan molekullar lipidlər adlandırılır. Qlükoza və ya amin turşuları kimi hidrofil molekullardan fərqli olaraq lipidlər, molekulları və hüceyrələri bütün bədən boyu daşıyan su tərkibli dövretmə sisteminə malik olan qanda asanlıqla həll olmurlar. Əvəzində, xolesterin kimi lipidlər lipozulallar adlanan hidrofil daşıyıcılar daxilinə yerləşdirilməlidir ki, özlərini qanda həll edə bilib bütün bədən boyu daşına bilsinlər. Hər bir lipozülal daşıyıcı mərkəzinə və ya özəyinə yüzlərlə və ya minlərlə lipid molekulları bağlana bilir. Hidrofob özək su ilə qarşılıqlı təsirdə olan hidrofil hissələrə və bir-biri ilə və özəklə qarşılıqlı əlaqədə olan hidrofob hissələrə malik olan amfipatik molekullarla əhatə olunur. Lipidlərin lipozülallara bükülməsi (Fəsil 14-də müzakirə olunur) onların qanda effektiv şəkildə daşınmasına imkan verir və yükün effektiv şəkildə yük gəmilərində, qatarda və yük maşınlarında uzaq məsafəyə daşınmasındakı konteynerləşdirməni xatırladır.

Yüksək sıxlıqlı lipozülallar (high-density lipoprotein - **HDL**) və aşağı sıxlıqlı lipozülallar (low- density lipoprotein – **LDL)** iki tip lipozülal daşıyıcılar olub uyğun olaraq azalan və ya induksiya olunan ürək xəstəlikləri ilə əlaqəlidirlər və ona görə də bəzən onlara "yaxşı" və ya "pis" xolesterin adı da verirlər. Həqiqətən də, xolesterin molekulları və onların həm HDL, həm də LDL vasitəsi ilə daşınan törəmələri mahiyyətcə eynidirlər və özləri nə "yaxşı", nə də "pis"dirlər. Amma HDL və LDL hüceyrədə fərqli təsirə malikdirlər və bu səbəbdən LDL arteriaların (*ateroskleroz* kimi məlum olan) çirklənməsinə və nəticədə ürək xəstəliklərinin və insultun yaranmasına kömək edir. HDL isə onu çirklənmədən və bunların bütün fəsadından mühafizə edir. Beləliklə LDL "pis" xolesterin kimi tanınır.

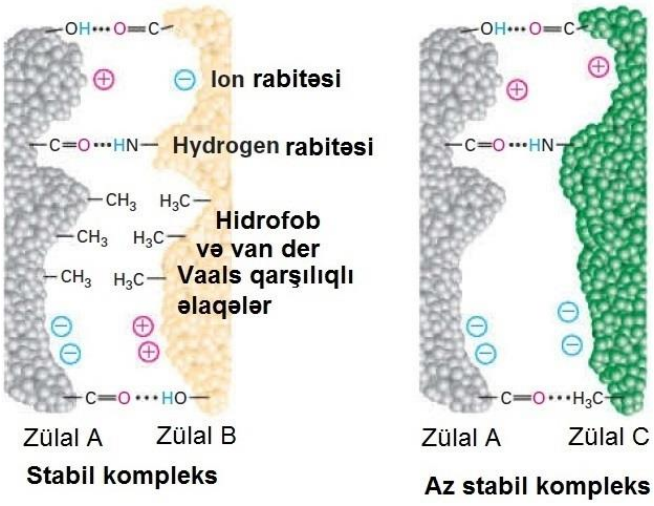
Qeyri-kovalent Qarşılıqlı Təsir Nəticəsində Molekulyar Komplementarlıq Biomolekullar Arasında Kilid və Açar Uyğunluğunu Əmələ Gətirir

Hüceyrənin həm daxilində, həm də xaricində ionlar və molekullar konstant şəkildə toqquşurlar. İstənilən tip molekulun qatılığı nə qədər yuxarı olarsa onların bir-biri ilə toqquşma ehtimalı bir o qədər yuxarı olur. İki molekul bir-biri ilə toqquşan zaman çox güman ki, sadəcə olaraq hərəsi bir tərəfə sıçrayacaq, çünki onları bir yerə bağlamalı olan qeyri-kovalent qarşılıqlı təsirlər zəifdir və fizioloji temperaturda ani mövcud olurlar. Amma **molekulyar komplementarlıq** göstərən molekullar formaları, yükləri və başqa fiziki xüsusiyyətləri arasında açar və kilid kimi uyğun gəlir, yaxın məsafədəki çoxsaylı qeyri-kovalent qarşılıqlı təsiri formalaşdırırlar. Quruluşuna görə komplementar olan iki belə molekul bir-birinə toqquşarsa, belə çoxsaylı qarşılıqlı təsirlər onların bir yerə yapışmasına və ya bağlanmasına səbəb olur.

Şəkil 2-12, çoxsaylı, müxtəlif zəif qarşılıqlı əlaqələrin iki güman olunan zülalı sıx şəkildə necə birləşdirdiklərini göstərir. Belə zülalın-zülala molekulyar komplementarlığının çoxsaylı

nümunələri bu kitab boyu rast gəlinəcək (məsələn bax Şəkillər 16-8, 16-9 və 16-11). Demək olar ki, eyni qrup molekulların iki səthdə istənilən başqa düzülüşləri molekulların belə sıx birləşməsinə imkan verə bilməzdilər. Zülal molekulu daxilində rayonlar arasında bu cür molekulyar komplementarlıq onun unikal üçölçülü quruluşda bükülməsinə imkan yaradır (Fəsil 3); DNT-nin iki zənciri də ikiqat zəncirdə bu cür bükülür (Fəsil 5). Oxşar qarşılıqlı əlaqələr molekulların qruplarının birləşərək çoxmolekullu qruplaşmalarını və ya komplekslərini yaradır, məsələn, əzələ liflərinin yaranmasına, bərk toxumalarda hüceyrələr arasında yapışqanşəkilli assosasiyaların yaranmasına və bir sıra başqa hüceyrə quruluşlarının yaranmasına aparır. Patogenlərin neytrallaşdırılmasına kömək edən anticismlər (bax Fəsil 23) komplementar molekulyar formaların oxşar prinsiplərindən istifadə edərək onlara birləşir.

İki molekul arasında və onların əhatəsində olan qeyri-kovalent əlaqələrin sayından və gücündən asılı olaraq onların birləşməsi sıx və ya boş (zəif) ola bilir, nəticədə onlar uzunmüddətliu və ya keçici (ani) ola bilir. İki molekulun bir-birinə *affinliyi* nə qədər yüksək olarsa, onların molekulyar uyğunluğu bir o qədər çox olur, nə qədər çox qeyri-kovalent əlaqə formalaşarsa onlar bir o qədər sıx birləşirlər. Affinliyin çox əhəmiyyətli kəmiyyət ölçüsü Bölmə 2.3-də təsvir edilmiş, birləşdirici dissosasiya konstantı K_d-dir. Qeyd etmək çox vacibdir ki, böyük bioloji molekulların çoxu ağır, sərt quruluşda deyil, əksinə necəsə asan yola gələndir (daha az sərtdir). Beləliklə, molekulun başqasına birləşməsi birləşdiyi tərəfdaşın formasında dəyişikliyin yaranmasını induksiya etmək potensialına malikdir. Belə qarşılıqlı əlaqədən sonra molekulyar komplementarlıq artırsa bu proses *induksiya olunan uyğunlaşma* adlanır.



ŞƏKİL 2-12 Molekulyar komplementarlıq, çoxsaylı qeyri-kovalent qarşılıqlı əlaqələr vasitəsi ilə möhkəm zülal birləşmələrinə imkan yaradır. İki zülal səthinin komplementar formaları, yükləri, polyarlıqları və hidrofobluğu çoxsaylı zəif qarşılıqlı əlaqələrin yaranmasına imkan verir, bunların da kombinasiyası güclü qarşılıqlı əlaqəni və sıx birləşməni yaradır. Molekulyar komplementarlıqdan kənarlanma birləşməni kifayət qədər zəiflətdiyindən verilmiş istənilən biomolekulun xüsusi səth rayonu adətən bir və ya çox məhdud sayda başqa molekula sıx şəkildə birləşə bilir. Soldakı iki zülal molekulunun komplementarlığı onlara sağdakı qeyri-komplementar zülallara nisbətən daha çox şəkildə birləşməyə imkan verir.

Fəsil 3-də müzakirə edəcəyimiz kimi, hüceyrədə baş verən kimyəvi reaksiyaların demək olar ki, hamısı fermentlərin birləşmə xüsusiyyətindən asılıdır. Bu zülallar reaksiyanı yalnız sürətləndirmir və ya kataliz etmir, eyni zamanda *yüksək spesifiklik* göstərir, yəni bu özünü onların yalnız bir və ya çox az sayda bir neçə molekula birləşmə qabliyyətində biruzə verir. Molekulyar komplementarlıqdan asılı olan molekullararası qarşılıqlı əlaqənin və ya reaksiyanın spesifikliyi həyat üçün kritik əhəmiyyətli olan proseslər üçün vacibdir.

2.1 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

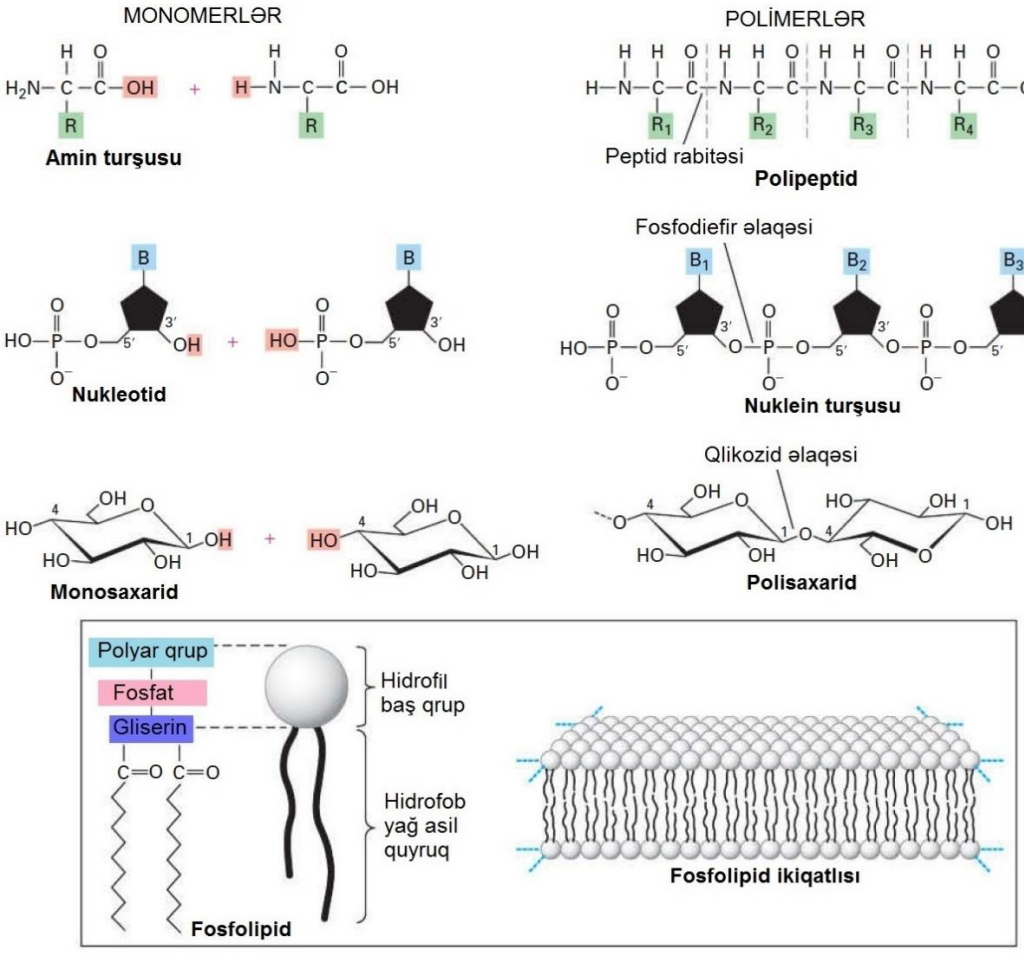
Kovalent Rabitələr və Qeyri-kovalent Qarşılıqlı Əlaqələr

- Hidrofillik, hidrofobluq və amfipatlik/amfifillik terminləri molekulların suyu sevmək meylliliyinə, su ilə əlaqəyə girə bilməmək və müvafiq olaraq hər ikisinə tolerant olmaq və ya olmamaq xüsusiyyətinə aiddir. Hidrofil molekullar adətən asanlıqla suda həll olurlar, halbuki hidrofob molekullar suda çox pis həll olurlar və ya tamamilə həll olmurlar.
- Kovalent rabitələr iki atom tərəfindən bölüşmüş elektron cütündən təşkil olunub. Kovalent rabitələr molekulun atomlarını spesifik geometriyada düzür.
- Hüceyrədə çox molekullar an azı bir asimmetrik karbon atomuna malikdirlər, bu da dörd müxtəlif atomla birləşir. Belə molekullar **D** və **L** kimi işarələnən və müxtəlif bioloji fəallıqlara malik olan optik izomerlər şəkilində (güzgüdə əksi) mövcud olurlar (bax Şəkil 2-4). Bioloji sistemlərdə demək olar ki, bütün şəkərlər **D** izomerindədir, amma demək olar ki, bütün amin turşuları **L** izomerindədir.
- Kovalent rabitələrdə elektronlar bərabər və ya qeyri-bərabər bölüşə bilərlər. Elektromənfiliyinə görə fərqlənən atomlar polyar kovalent rabitə yaradırlar, bu zaman elektronlar qeyri-bərabər paylanır. Polyar rabitənin bir ucu qismən müsbət yüklü olur, digər ucu isə qismən mənfi yüklü olur (bax Şəkil 2-5).
- Kovalent rabitələr bioloji sistemlərdə stabildir, çünki onları qırmaq üçün tələb olunan nisbətən yüksək enerji (50-200 kkal/mol) otaq temperaturunda (25ºC) və ya bədən temperaturunda (37ºC) mümkün olan termal kinetik enerjidən çox yüksəkdir.
- Atomlar arasında qeyri-kovalent rabitələr kovalent rabitələrə nisbətən əhəmiyyətli dərəcədə zəif olur və enerjiləri 1-5 kkal/mol civarında olur (bax Şəkil 2-6).
- Bioloji sistemlərdə dörd əsas tip qeyri-kovalent qarşılıqlı əlaqələr mövcud olur: ion rabitələri, hidrogen rabitələri, van der Vaals qarşılıqlı təsir və hidrofob təsirlə yaranan qarşılıqlı əlaqələr.
- İon əlaqələri müsbət və mənfi yüklənmiş ionlar arasında elektrostatik cazibə nəticəsində yaranır. Su məhlulunda bütün kationlar və anionlar birləşmiş su molekulundan ibarət olan örtüklə əhatə olunur (bax Şəkil 2-7c). Məhlulda duz (məsələn, NaCl) qatılığının artması biomolekullarda ion əlaqələrinin nisbi möhkəmliyini zəiflədə bilir və hətta onu qıra bilir.

- Hidrogen rabitəsində elektromənfi yüklənmiş atoma kovalent birləşmiş hidrogen atomu akseptor atomla assosasiya edir, akseptor atomun birləşməmiş elektron cütü hidrogeni cəzb edir (bax Şəkil 2-8).
- Zəif və nisbətən qeyri-spesifik van der Vaals qarşılıqlı təsir bütün molekullarla bağlı olan keçici (ani) dipollar arasındakı cazibə nəticəsində yaranır. Onlar iki atom bir-birinə çox yaxınlaşan zaman formalaşır (bax Şəkil 2-10).
- Su mühitində qeyri-polyar molekullar və ya böyük molekulların qeyri-polyar hissəsi hidrofob təsirin nəticəsində bir yerə gətirilir və beləliklə onların su molekulu ilə birbaşa əlaqəsi azalır (bax Şəkil 2-11).
- Molekulyar komplementarlıq formasına, yükünə və başqa fiziki xassələrinə görə komplementar olan molekullar arasında olan açar və kilid uyğunluğudur. Çoxsaylı qeyri-kovalent qarşılıqlı təsir komplementar molekullar arasında yarana bilir və onların biri-biri ilə sıx birləşməsinə səbəb olur (bax Şəkil 2-12), amma qeyri-komplementar molekullar arasında yaranmır.
- Molekulyar komplementarlıq nəticəsində yaranan yüksək dərəcədə birləşmə spesifikliyi, biologiyada molekullararası qarşılıqlı təsirin əsasında duran xüsusiyyətlərdən biridir və ona görə də kritik həyati əhəmiyyətli proseslər üçün vacibdir.

2.2 Hüceyrənin Kimyəvi Quruluş Blokları

Biologiyanın ümumi mövzusu böyük **makromolekulların** və makromolekulyar quruluşların kiçik molekulyar subvahidlərdən təşkilidir. Çox zaman belə subvahidlər oxşar və ya identik olur. Bioloji makromolekulların üç əsas tipi – zülallar, polisaxaridlər və nuklein turşuları – hamısı **polimerlər** olub kovalent rabitə ilə birləşmiş çoxsaylı quruluş blokları olan kiçik molekullardan - **monomerlərdən** təşkil olunmuşlar (Şəkil 2-13). **Zülallar** xətti polimerlər olub 10-dan bir neçə minə qədər **peptid əlaqələri** ilə birləşmiş amin turşularından ibarətdirlər. **Nuklein turşuları** xətti polimerlər olub **fosfodiefir əlaqələri** ilə birləşmiş yüzlərlə - millionlarla nukleotid monomerlərdən təşkil olunmuşdur. **Polisaxaridlər** qlükoza kimi monosaxaridlərin (şəkərlərin) xətti və ya şaxələnmiş polimerləri olub **qlikozid əlaqələri** ilə birləşmişlər.



ŞƏKİL 2-13 Hüceyrənin əsas kimyəvi quruluş bloklarına ümumi baxış. (*Yuxarıda*) Üç əsas tip bioloji makromolekulların hər biri xüsusi tipdə çoxsaylı kiçik molekulların (monomerlərin) polimerləşməsi nəticəsində yığılmışdır: zülallar amin turşularından (bax Fəsil 3), nuklein turşuları nukleotidlərdən (bax Fəsil 4) və polisaxaridlər isə monosaxaridlərdən (şəkərlərdəm) toplanmışlar. Hər bir monomer kovalent rabitə ilə polimerdə, son nəticəsi bir molekul suyun itirildiyi (*dehidrasiya*) kimyəvi reaksiya ilə toplanır. (*Aşağıda*) Bunun əksinə, fosfolipid monomerlər qeyri-kovalent rabitə ilə ikiqatlı quruluşda yığılırlar, bu da hüceyrə membranının əsasını təşkil edir (bax Fəsil 10).

Hərçənd ki, monomerlər arasında kovalent rabitənin formalaşmasının əsil mexanizmi mürəkkəbdir və bizim görəcəyimiz kimi, iki monomer molekul arasında kovalent rabitənin formalaşması adətən bir monomerdən hidrogenin (H) və digər monomerdən hidroksilin (OH) xalis itirilməsi və ya xalis bir molekul suyun ayrılması (itirilməsi) daxildir, ona görə də buna *dehidrasiya reaksiyası* kimi baxıla bilər. Polimerdə monomer subvahidləri azad edən bu əlaqənin qırılması və ya kəsilməsi geriyə reaksiyası ilə yəni suyun daxil edilməsi ilə gedir və *hidroliz* adlanır. Monomerləri bir yerə birləşdirən bu əlaqələr qanunauyğun olaraq, normal bioloji şəraitdə (məsələn, 37ºC, neytral pH) stabil olurlar və beləliklə bu polimerlər stabildirlər və hüceyrədə geniş müxtəliflikdə vəzifəni, məsələn informasiyanın saxlanması, kimyəvi reaksiyaların katalizi, müəyyən hüceyrə formasında quruluş elementi rolunu oynamaq və hüceyrənin hərəkəti və çoxsaylı başqa funksiyaları yerinə yetirirlər. Makromolekulyar quruluşlar qeyri-kovalent qarşılıqlı təsirlə də yığıla bilir. Bir qatlı və ya iki qatlı quruluşa malik olan hüceyrə membranları qeyri-kovalent əlaqələrlə birləşməklə minlərlə fosfolipidlər adlanan kiçik molekullardan qurulmuşlar (bax Şəkil 2-13).

Bu fəsildə biz nəzərimizi hüceyrəni təşkil edən kimyəvi quruluş blokları – amin turşuları, nukleotidlər, şəkərlər və fosfolipidlər üzərində cəmləyirik. Zülalların, nuklein turşularının, polisaxaridlərin və biomembranların quruluşu, funksiyası və toplanması növbəti fəsillərdə müzakirə olunacaq.

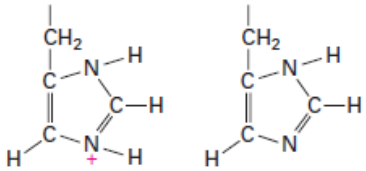
Yalnız Yan Zəncirinə Görə Fərqlənən Amin Turşuları Zülalları Təşkil Edirlər

Zülalların monomeri quruluş blokları 20 **amin turşusundan** ibarətdir, bunlar zülalların tərkibində yığılarkən çox hallarda **qalıqlar** adlandırılır. Bütün amin turşuları xarakterik quruluşa malikdirlər, onlar mərkəzi **alfa karbon atomundan** (C_α) və ona birləşmiş dörd müxtəlif kimyəvi qrupdan: amin qurupu ($–NH_2$), karboksil və ya karboksil turşu qrupundan (–COOH) (*amin turşusu* adı da buradan meydana gəlmişdir), hidrogen atomu (H) və bir də müxtəlif amin turşularında fərqli olan *dəyişkən* qrupdan, buna ***yan zəncir*** və ya ***R qrup*** da deyilir. Qlisindən başqa bütün amin turşularında α karbon asimmetrik olduğundan, bu molekullar güzgüdə bir birinin əksi olan iki formada olurlar, konvensiya görə bunlar **D** (dextro) və **L** (levo) adlandırılır (bax Şəkil 2-4). Bu iki izomer bunların birində kimyəvi qrupları qırıb yenidən birləşdirmədən heç zaman bir-birinə çevrilmirlər (biri o birinə identik olmurlar). Çox nadir istisnalarla zülallarda amin turşularının yalnız **L** forması tapılmışdır. Amma **D** amin turşuları bakterial hüceyrə divarlarında və digər mikrob məhsullarında çox yayılmışlar.

Zülalların, Fəsil 3-də müzakirə olunan üçölçülü quruluşunun və funksiyasının anlaşılması üçün siz amin turşularının bəzi fərqli xassələri ilə tanış olmalısınız, bu da əsasən onların yan zəncirlərinin xüsusiyyətləri ilə təyin edilir. Zülalların necə fəaliyyət göstərdiyini anlamaq üçün sizə hər bir tip yan zəncirin ətraflı quruluşunu yadda saxlamaq lazımdır, çünki amin turşuları ölçüsünə, formasına, yükünə, hidrofobluğuna (suda həllolma qabliyyətinə) və yan zəncirlərin kimyəvi reaktivliyinə əsaslanaraq bir neçə geniş kateqoriyada təsnifləşdirilə bilirlər (Şəkil 2-14).

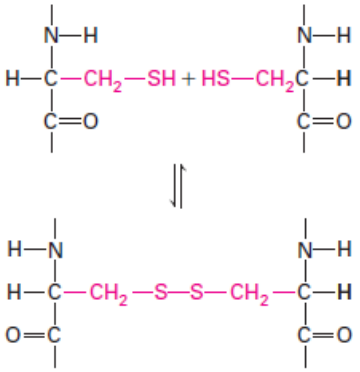
Qeyri-polyar yan zəncirə malik olan amin turşuları hidrofob amin turşuları adlandırılır və suda pis həll olurlar. Qeyri-polyar yan zəncir böyük olduqca, amin turşusu bir o qədər hidrofob olur. *Alanin, valin, leysin* və *izoleysinin* yan zəncirləri xəttidir və ya həlqə əmələ gətirməyən şaxələnmiş karbohidrogenə malikdir, ona görə də alfatik amin turşuları adlandırılır. Bu amin turşularının hamısı onlara oxşar olan, amma bir kükürd atomuna malik olan *metionin* kimi qeyri-polyardır. *Fenilalanin, tirozin* və *triptofan* yan zəncirində böyük, hidrofob, aromatik həlqəyə malikdirlər. Sonrakı fəsillərdə biz hidrofob yan zəncirlərin hidrofob təsir altında zülalın daxilinə necə büküldüyünü və ya biomembranın hidrofob hissəsinə batmış (yüklənmiş) zülalların səthində necə düzüldüyini ətraflı görəcəyik.

Polyar yan zəncirə malik olan amin turşuları hidrofillər adlanırlar; bu amin turşularının əsas hidrofilləri, həm hüceyrə daxilində, həm də hüceyrə xaricində bioloji mayelər üçün tipik olan pH-da yüklənən (ionlaşan) yan zəncirə malik olan yarımqruplardır. *Arginin* və *lizin* müsbət yüklənmiş yan zəmcirə malikdirlər və əsasi amin turşuları adlanırlar; *asparagin turşusu* və *qlutamin turşusu* yan zəncirindəki karboksil qruplarına görə mənfi yüklənmiş yan zəncirə malikdirlər (onların yüklənmiş forması *aspartat* və *qlutamat* adlanır) və turş amin turşularıdırlar. Beşinci amin turşusu *histidin*, imidazol adlanan iki azotlu həlqəyə malik olan yan zənciri vardır, mühitin turşuluğundakı kiçik dəyişiklikdən asılı olaraq müsbət yüklənmiş formadan yüklənməmiş formaya keçə bilir:



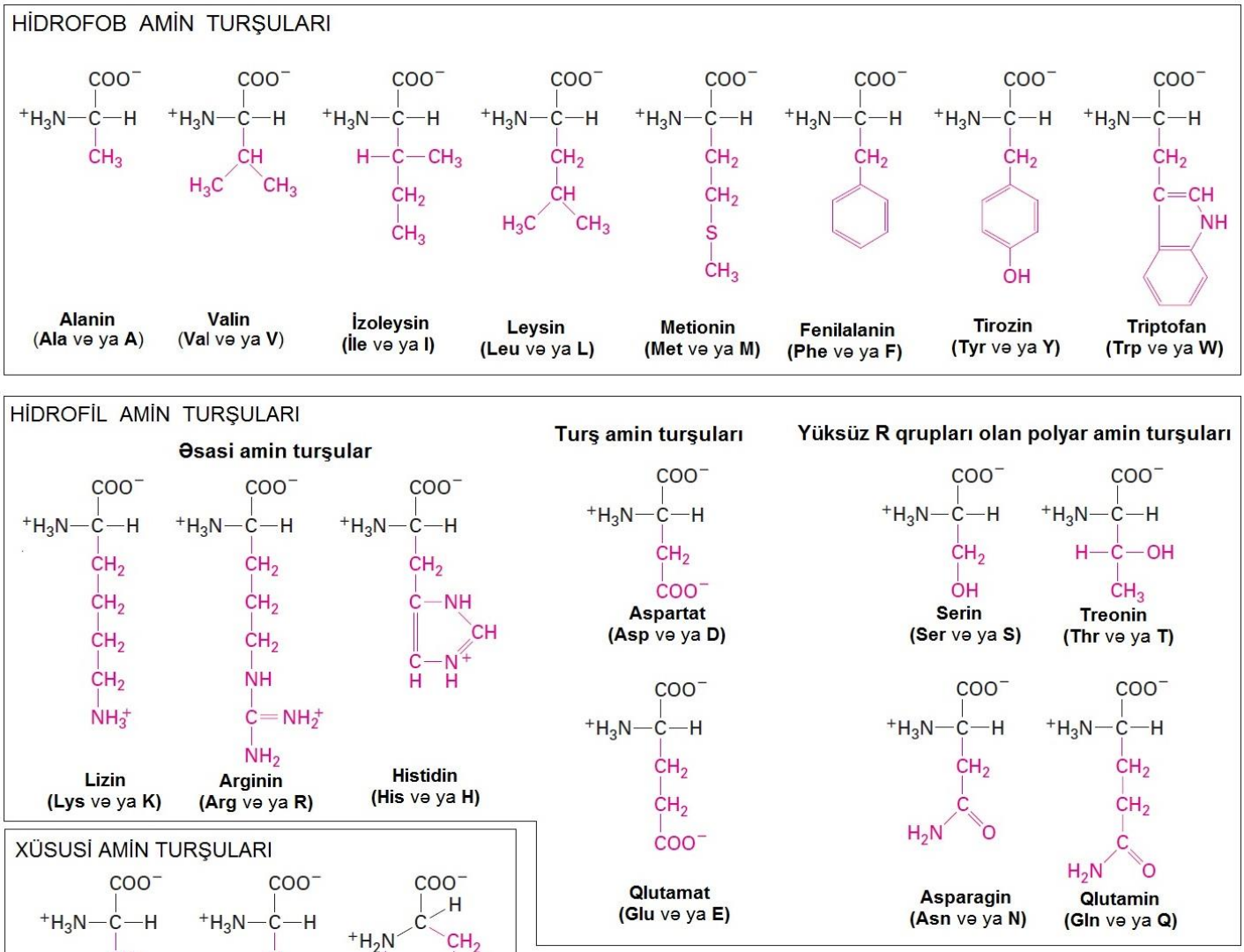
Çox zülalların fəallığı mühitin turşuluğunu (pH) dəyişməklə, histidinin yan zəncirində protonlaşdırma və ya deprotonlaşdırma yolu ilə modulyasiya oluna bilər. *Asparagin* və *qlutamin* yüksüzdürlər, amma geniş hidrogen birləşdirmə qabliyyətli amin qrupuna malik olan polyar yan zəncirə malikdirlər. Buna oxşar olaraq *serin* və *treonin* yüksüzdirlər, amma polyar hidroksil qrupuna malikdirlər və başqa polyar molekullarla geniş hidrogen əlaqələrin yaranmasında iştirak edirlər.

Nəhayət, *sistein, qlisin* və *prolin* onların yan zəncirindəki unikal xassəyə görə zülallarda xüsusi rola malikdirlər. *Sisteinin* yan zənciri reaktiv *sulfhidril qrupa* malikdir (*–SH*). Protonu (H^+) buraxarkən sulfhidril qrup tiolat anionuna (S^-) çevrilir. Tiolat anion kataliz zamanı əhəmiyyətli rol oynaya bilir, xüsusən də zülalları parçalayan fermentlərdə (proteazalarda). Zülallarda bir-birinə yaxın yerləşmiş iki sulfhidril qruplar, hər biri proton və elektronunu buraxmaqla kovalent *disulfid rabitəsini* (—S—S—) əmələ gətirirlər:

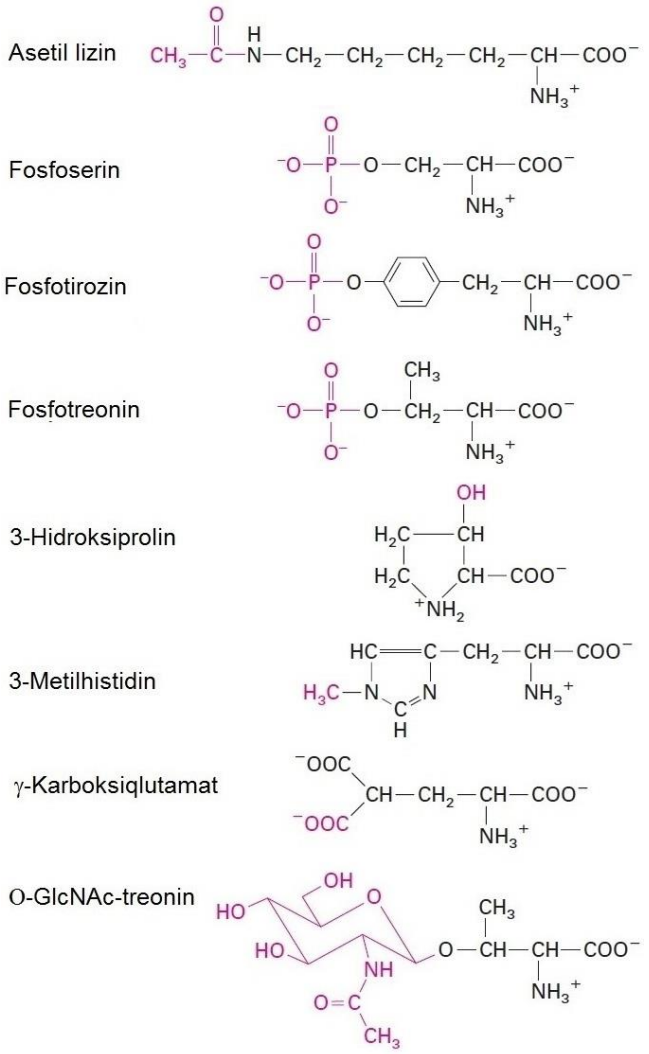


Disulfid rabitə bir polipeptid zəncir daxilində (molekuldaxili) və ya iki ayrıca zəncir arasında (molekullararası) rayonların "kəsişmə-əlaqəsini" həyata keçirir. Disulfid rabitələr bəzi zülallarda bükülmüş quruluşu stabilləşdirir. Ən kiçik amin turşusu *qlisin,* R qrupunda tək bir hidrogen atomuna malikdir. Onun kiçik ölçüsü ona kiçik fəzada yerləşməyə imkan verir. Başqa çox yayılmış amin turşularından fərqli olaraq *prolinin* yan zənciri (pro-liin kimi tələfüz olunur) ətrafında əyilərək, C_α-ya birləşmiş azot atomuna kovalent birləşərək həlqə əmələ gətirir. Bunun nəticəsində, prolin çox sərtdir və amin qrupu tipik hidrogen əlaqəsi üçün mümkün deyil. Zülalda prolinin olması polimer zəncirdə, prolin qalığı nahiyəsində zəncirin bükülməsini məhdudlaşdıraraq qeyri-adi qısa ilgək əmələ gətirir.

Bəzi amin turşuları zülalda başqalarından daha zəngindirlər. Sistein, triptofan və metionin ümumi amin turşularından deyillər: onlar birlikdə tipik zülalda amin turşuların təxminən 5%-ni təşkil edirlər. Dörd amin turşusu – leysin, serin, lizin və qlutamin turşusu – çox geniş yayılmış amin turşularına aid deyillər, ümumilikdə tipik zülalda bütün qalıqların 32%-ni təşkil edirlər. Amma zülalların amin turşu tərkibi bu qiymətlərdən çox kənara çıxaraq dəyişilə bilirlər.



ŞƏKİL 2-14 Zülalların sintezində istifadə olunan 20 amin turşusu. Yan zəncir (R qurup; qırmızı) hər bir amin turşusunun xarakterik xassəsini müəyyən edir və amin turşularını üç əsas kateqoriyaya bölməyin əsasını təşkil edir: hidrofob, hidrofil və xüsusi. Göstərilənlər sitozol pH-ında (≈7) mövcud olan ionlaşan formalardır. Mötərizədəkilər hər bir amin turşusunun üç hərfli və bir hərfli qısaltmalarıdır.



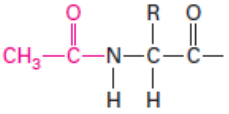
ŞƏKİL 2-15 Zülallarda amin turşularının yan zəncirlərinin ümumi modifikasiyaları. Bu modifikasiya olunmuş qalıqlar və çoxsaylı başqaları, müxtəlif kimyəvi qrupların (qırmızı) amin turşularının yan zəncirinə, polipeptid zəncirin sintezi zamanı və ya sintezindən sonra əlavə olunması ilə formalaşmışdır.

İnsanlar və digər məməlilər 20 amin turşusundan 11-ni sintez edə bilirlər. Qalan doqquz amin turşusu *əhəmiyyətli amin turşuları* sırasına daxildirlər və normal zülal istehsalı üçün qida ilə alınmalıdırlar. Bunlar fenilalanin, valin, treonin, triptofan, izoleysin, metionin, leysin, lizin və histidindirlər. Bu əhəmiyyətli amin turşularının qida məhsullarına kifayət gədər daxil edilməsi heyvandarlıq sənayesinin əsasıdır. Həqiqətən də genetik mühəndislik yolu ilə alınmış, yüksək lizinə malik olan qarğıdalı indi heyvanların inkişafını sürətləndirmək üçün "gücləndirilmiş" qida kimi istifadə olunur.

Baxmayaraq ki, hüceyrələr zülalların ilkin sintezi zamanı Şəkil 2-14-də göstərilmiş 20 amin turşusundan istifadə edirlər, amma hüceyrə zülallarının analizi aşkar etdi ki, onlar 100 qədər müxtəlif amin turşularından təşkil olunmuşlar. Fərq bəzi amin turşularının zülal zəncirinə yığılmasından sonra asetil qurupunun (CH_3CO) və başqa müxtəlif kimyəvi qrupların əlavə olunması ilə baş verən kimyəvi modifikasiyaya uğraması nəticəsində əmələ gəlir (Şəkil 2-15). Başqa bir əhəmiyyətli modifikasiya serinin, treonin və tirozin qalıqlarının hidroksil qrupuna fosfatın (PO_4) əlavə olunmasıdır və bu proses fosforlaşma kimi məlumdur. Biz fosforlaşma və defosforlaşma ilə fəallıqları tənzimlənən zülalların çoxsaylı nümunələri ila rastlaşacağıq.

Histidinin yan zəncirində azotun fosforlaşması bakteriyalarda, göbələklərdə və bitkilərdə çox məlum olan haldır, amma fosforlaşmış histidinin yəqin ki, nisbətən qeyri-satbil olmasına görə və görünür ki, onun məməlilərdə seyrək olması üzündən heyvanlarda az öyrənilmişdir. Arginin və lizinin yan zəncirinin histonlar adlanan zülallarda metilləşməsi eukariotlarda gen ekspressiyasının əsas tənzimləyicilərindəndir (bax Fəsil 9). Fosforlaşma və defosforlaşma kimi nizamlanan metilləşmə və demetilləşmə də əhəmiyyətli tənzimləyici proseslərdir. Asparagin, serin və treoninin yan zəncirləri qlikozilləşmə, karbohidrat zəncirinin xətti və şaxələnmiş vəziyyətdə birləşdiyi saytıdır. Çox ifraz olunan zülallar və membran zülalları qlikozilləşmiş qalıqlara malik olurlar və spesifik serin və treonin qalıqlarında karboksil qrupunun N-asetilqlükozamin adlanan şəkərlə geriyə dönən modifikasiyası zülalların fəallığını da həmçinin tənzimləyir. Seçilmiş zülallarda tapılan başqa aminturşu modifikasiyalarına kollagendə prolin və lizin qalıqlarında hidroksilləşmə (bax Fəsil 19), membran reseptorlarında histidinin metilləşməsi və protrombin kimi qan laxtalanması faktorunda qlutamatın γ karboksilləşməsi daxildirlər. Asn və Gln uyğun olaraq Asp və Glu amin turşularına deamidləşməsi də həmçinin geniş rast gəlinən haldır.

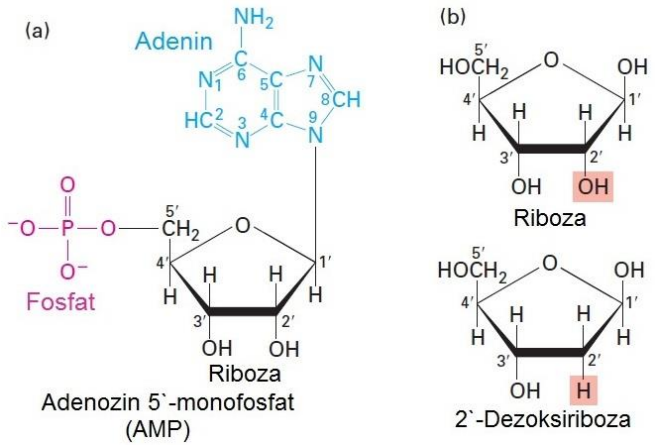
N-sonluqlu qalığın amin qrupunun asetilləşməsi amin turşusunun kimyəvi modifikasiyalarının daha çox rast gəlinən formasıdır və bütün zülalların 80 faizinə yaxını bu modifikasiyaya məruz qalırlar:



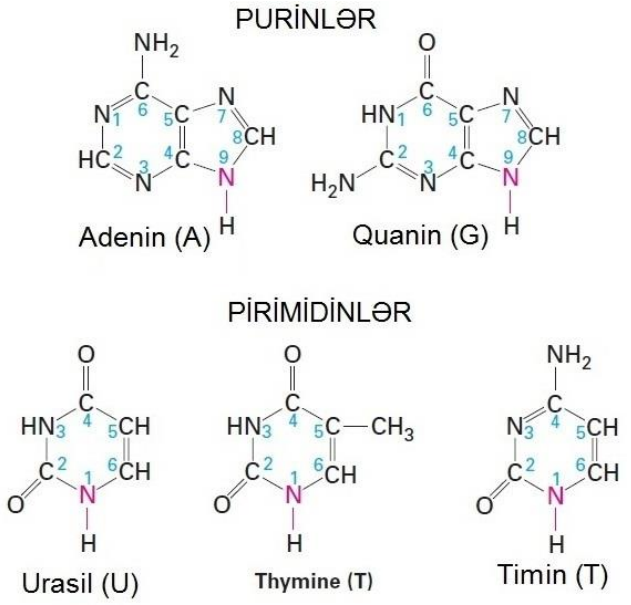
Bu modifikasiya hüceyrə daxilində zülalların həyat dövrünə nəzarət etməklə əhəmiyyətli rol oynaya bilir, çünki asetilləşməmiş çoxsaylı müxtəlif zülallar sürətlə parçalanırlar.

Beş Müxtəlif Nukleotid Nuklein Turşularının Qurulmasında İstifadə Olunur

Kimyəvi cəhətdən oxşar olan iki tip nuklein turşusu, **DNT** (**dezoksiribonuklein turşusu**) və **RNT** (**ribonuklein turşusu**) hüceyrənin əsas genetik informasiya daşıyan molekullarıdırlar. DNT və RNT polimerlərinin qurulduğu, **nukleotidlər** adlanan monomerlər hamısı ümumi quruluşa malikdirlər: fosfat qrupu fosfodiefir əlaqəsi ilə pentoza (beş karbonlu) şəkərinə birləşmişdir, o isə öz növbəsində, tərkibi karbon və azotdan təşkil olunmuş, ümumilikdə *əsas* adlandırılan həlqəvi quruluşa (Şəkil 2-16a) birləşmişdir. RNT-də pentoza ribozadır, DNT-də isə o 2′ vəziyyətində hidroksil qrupu əvəzinə proton olan dezoksiribozadır (Şəkil 2-16b). (Şəkərin quruluşunu biz ətraflı şəkildə aşağıda təsvir edəcəyik.) *Adenin*, *quanin* və *sitozin* əsasları (Şəkil 2-17) həm DNT-də, həm də RNTdə tapılmışdır, *timin* əsası yalnız DNT-də, *urasil* əsası isə yalnız RNT-də tapılmışdır.



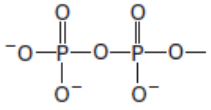
ŞƏKİL 2-16 Nukleotidlərin ümumi quruluşu. (a) Adenozin 5′-monofosfat (AMP), nukleotid RNT-də rast gəlinir. Konvensiyaya görə nukleotidlərdə pentoza şəkərindəki karbon atomu ştrixlə nömrələnir. Təbii nukleotidlərdə 1′ karbon β əlaqə ilə əsasa (indiki halda adenin) birləşmişdir; həm əsas (mavi), həm də 5′ hidroksilдəki (qırmızı) fosfat şəkər həlqəsi üzərində müstəvidə uzanmışdır. (b) Riboza və dezoksiriboza uyğun olaraq RNT və DNT-də olan pentozalardır.



ŞƏKİL 2-17 Nuklein turşularındakı başlıca əsasların kimyəvi quruluşu. Nuklein turşularında və nukleotidlərdə purinin 9-cu azotu və pirimidinin 1-ci azotu (qırmızı) ribozanın və ya dezoksiribozanın 1′ karbonuna birləşmişlər. U yalnız RNT-də tapılmışdır və T isə yalnız DNT-də tapılmışdır. Həm RNT, həm də DNT A, G və C-yə malikdirlər.

Adenin və quanin **purin**dirlər, iki bir-birinə qovuşmuş həlqəyə malikdirlər; sitozin, timin və urasil **pirimidin**dirlər, bunlar bir həlqəyə malikdirlər (bax Şəkil 2-17). Əsaslar çox vaxt qısaltmalarla verilir, bunlar uyğun olaraq A, G, C, T, və U kimi qısaldılmışlar, bu cür eyni bir hərfli qısaldılma nuklein turşusu polimerlərində bütün nukleotidləri göstərmək üçün də ümumi istifadə olunur. Nukleotidlərdə şəkərin (riboza və ya dezoksiriboza) 1′ karbon atomu purinin 9 vəziyyətindəki azotuna (N_9), və ya pirimidində 1 vəziyyətindəki azota (N_1) birləşir. Nukleotidlərin turşuluq xüsusiyyəti fosfat qrupuna görədir, bunlar normal hüceyrə daxili şəraitdə hidrogen ionlarını (H^+) buraxır və fosfatı mənfi yüklənmiş halda saxlayırlar (bax Şəkil 2-16a). Hüceyrələrdə nuklein turşularının əksər hissəsi zülallarla birləşmiş vəziyyətdə olur və zülallar mənfi yüklənmiş fosfatlarla ion qarşılıqlı əlaqə yaradırlar.

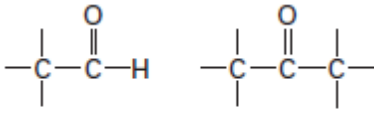
Orqanizmdə hüceyrələr və hüceyrəxarici mayelər aşağı qatılıqda **nukleotidlərə,** fosfatsız şəkərin **əsasla** kombinasiyasına malik olurlar. Nukleotidlər fosfodiefir əlaqəsi ilə 5′ hidroksil qrupuna birləşmiş bir, iki və ya üç fosfat qruplarına malik olan nukleozidlərdir. *Efirləşmə* – mürəkkəb efirin formalaşmasına karboksil turşusu və ya fosfat turşusu kimi turşuların spirtlə kovalent birləşməsi və bu zaman hidroksil (–OH) qrupunun turşudan və H-in isə digər molekuldakı hidroksil qrupundan buraxılması və onların birlikdə suyu əmələ gətirməsi daxildir. Burada fosfat turşusu ribozanın 5′ hidroksil qrupu ilə efirləşir. Nukleozid monofosfatlar efir rabitə ilə birləşmiş vahid fosfata malikdir (bax Şəkil 2-16a), nukleozid difosfatlar pirofosfat qrurpuna malikdir:



və nukleozid trifosfatlar üçüncü fosfat qrupuna da malikdir. Cədvəl 2-3-də nuklein turşularındakı nukleozid və nukleotidlərin, həmçinin müxtəlif nukleozid difosfat formalarının adları göstərilmişdir. Nukleozid trifosfatlar nuklein turşularının sintezində istifadə olunur, biz onu Fəsil 5-də göstəririk. Onların hüceyrədə çoxsaylı başqa funksiyaları arasında GTP-nin hüceyrədaxili siqnal sistemində də iştirak etməsi və enerji ehtiyatı rolunu oynaması da, xüsusən də zülalların sintezində, vardır. Bu fəsildə sonra müzakirə olunduğu kimi, ATP də ən geniş istifadə olunan bioloji enerji daşıyıcısıdır.

Monosaxaridlər Xətti Və Şaxələnmiş Polisaxaridlərdə Kovalent Toplanırlar

Polisaxaridlərin quruluş blokları sadə şəkərlər və ya **monosaxaridlər**di. Monosaxaridlər **karbohidratlardır**, karbon və suyun eynən birin-birə bərabər nisbətində kovalent birləşmiş kombinasiyasıdır $(CH_2O)_n$, burada ***n*** 3, 4, 5, 6 və ya 7 bərabərdir. Heksozalar (***n*** = 6) və pentozalar (*n* = 5) çox yayılmış monosaxaridlərdir. Bütün monosaxaridlər hidroksil qrupuna (–OH) və ya aldehid ya da keton qurupuna malikdirlər:

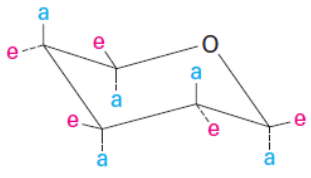


Bioloji əhəmiyyətə malik olan çox şəkərlərə heksozalar, o cümlədən qlükoza, mannoza və qalaktoza daxildirlər (Şəkil 2-18). Mannoza tərkibinə görə qlükoza ilə identikdir, fərq yalnız 2-ci karbonda birləşmiş qrupların istiqaməti əksinədir. Eynilə başqa heksoza, qalaktoza qlükozadan 4-cü karbona birləşmiş qrupların istiqaməti ilə fərqlənir. Qlükozanın, mannozanın və qalaktozanın bir-birinə çevrilməsi onlarda qrupların kovalent

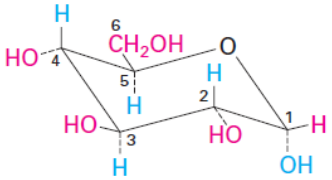
rabitəsinin qırılmasını və yenidən yığılmasını tələb edir. Bu cür reaksiya *epimerazalar* adlanan fermentlər tərəfindən aparılır.

D-qlükoza ($C_6H_{12}O_6$) çoxhüceyrəli mürəkkəb orqanizmlərdə əksər hüceyrələr üçün əsas xarici enerji mənbəyidir və üç müxtəlif formada mövcud ola bilir: xətti quruluşda və iki müxtəlif hemiasetal həlqə formasında (Şəkil 2-18a). Karbon 1-dəki aldehid qrupu karbon 5-dəki hidroksil qrupu ilə birləşir, nəticədə yaranan hemiasetal, **D**-qlükouranoza altıguşəli həlqəyə malik olur. **D**-qlükouranozanın **α** anomerində karbon 1-lə birləşmiş hidroksil qrupu Şəkil 2-18a-dan göründüyü kimi, həlqədən "aşağıya doğru" istiqamətlənir; β anomerdə isə bu hidroksil "yuxarıya doğru" istiqamətlənir. Su məhlulunda α və β anomerlər spontan şəkildə asanlıqla bir-birinə çevrilə bilirlər, burada tarazlıq təxminən üçdə bir α anomer və üçdə iki β anomer olan vəziyyətdə və çox az miqdarda açıq-zəncir forması ilədir. Fermentlər **D**-qlükozanın α və β anomerlərini fərqləndirə bildiyindən bu formalar müxtəlif bioloji rola malikdirlər. Xətti qlükozada karbon 4-ün hidroksil qrupunun onun aldehid qurupu ilə kondensasiyası **D**-qlükofuranozanın, beş-guşəli hemiasetal həlqənin yaranması ilə nəticələnir. Baxmayaraq ki, **D**-qlükozanın bütün üç forması bioloji sistemlərdə mövcuddur, piranoza (altıguşəli həlqə) forma hal-hazırda ən geniş yayılmış formadır.

Piranoz həlqə, Şəkil 2-18a-da müstəvi kimi təsvir edilmişdir. Faktiki olaraq karbon atomu ətrafındakı tetrahedral geometriyaya görə piranoza həlqəsinin ən stabil konformasiyası, qeyri-müstəvi konformasiyası olan stula bənzər formadır. Bu konformasiyada həlqə karbonlarından qeyri-həlqə atomlarına (məsələn, H və ya O) olan hər bir əlaqə demək olar ki, həlqəyə ya perpendikulyardır, buna aksial (a) deyilir, ya da həlqə müstəvisinə yönəlmişdir, bu da ekvatorial (e) kimi adlanır:



Puranozalar



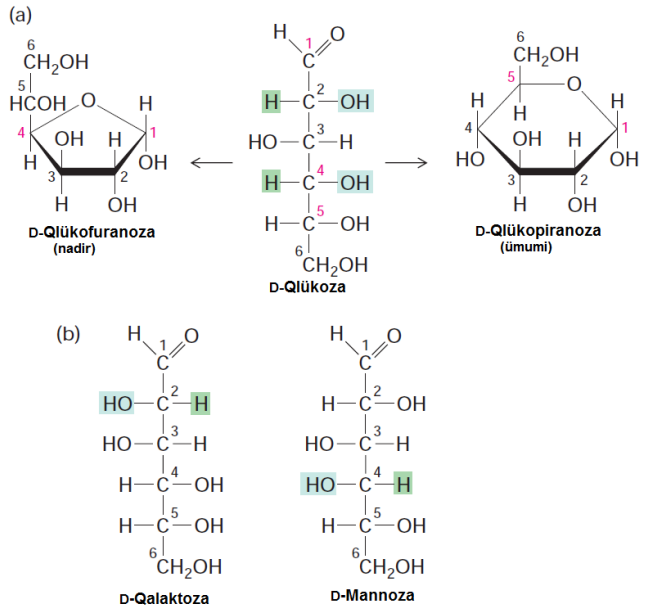
α-D-Qlükopuranoza

İki monosaxariddən əmələ gəlmiş disaxaridlər ən sadə polisaxariddirlər. Laktoza disaxaridi qalaktoza və qlükozadan təşkil olunmuşdur və südün əsas şəkərini təşkil edir; qlükoza və fruktozadan təşkil olunmuş saxaroza disaxaridi bitki fotosintezinin əsas məhsuludur və təmizlənmiş şəkildə məişət qəndinə daxildir (Şəkil 2-19).

Onlarla, yüzlərlə monosaxarid vahidlərindən təşkil olunmuş böyük polisaxaridlər qlükoza üçün ehtiyat mənbəyi rolunu, quruluş komponenti rolunu və ya hüceyrələri toxumada bir yerda saxlamağa kömək edən yapışqan rolunu oynaya bilir. Heyvan hüceyrələrində ən çox ümumi ehtiyat karbohidratı qlükozanın çox uzun, yüksək dərəcədə şaxələnmiş polimeri **qlikogendir**. Qaraciyərin ümumi çəkisinin 10 faizə qədəri qlikogendir. Bitki hüceyrələrində karbohidratların ilkin ehtiyat mənbəyi nişasta da həmçinin qlikozanın polimeridir, O şaxələnməmiş formada (amiloza) və yüngülcə şaxələnmiş formada (amilopektin) əmələ gəlir. Həm qlikogen, həm də nişasta qlükozanın α anomerindən təşkil olunmuşdur. Əksinə**,** bitki hüceyrə divarının əsas tərkib hissəsi olan, çoxsaylı bitki quruluşlarına sərtlik verən **sellüloza** (bax Fəsil 19) şaxələnməmiş polimer olub, qlükozanın β anomerindən təşkil olunmuşdur. İnsanın həzm fermentləri nişastadakı α qlikozid əlaqələrini hidroliz edə bilir, amma sellülozadakı β qlikozid əlaqələrini hidroliz edə bilmir. Çox bitki növləri, bakteriyalar və kif göbələkləri sellüloza parçalayan fermenti istehsal edirlər. İnəklər və termitlər sellülozanı parçalaya bilirlər, çünki onların bağırsaqlarında sellüloza parçalayan bakteriyalar yaşayır. Bakterial hüceyrə divarı, peptid körpülərlə çarpaz kəsişən və ona hüceyrə formasını və sərtliyini verən polisaxarid zənciri **peptidqlikan**dan təşkil olunub. İnsanın göz yaşı və mədə-bağırsaq şirəsi bakterial hüceyrə divarında pepridilqlikanı hidroliz edə bilən fermentə lizozimə malikdir.

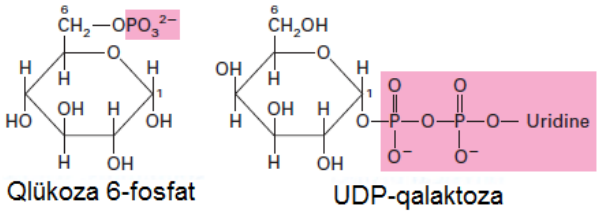
Cədvəl 2-3 Nukleozid və nukleotidlərin terminalogiyası

Əsaslar	Purinlər		Pirimidinlər	
	Adenin (A)	**Quanin (G)**	**Sitozin (C)**	**Uridin (U)** **Timidin (T)**
Nukleozidlər — RNT-də	Adenozin	Guanozin	Sitozin	Uridin
Nukleozidlər — DNT-də	Dezoksiadenozin	Dezoksiquanozin	Dezoksisitozin	Dezoksitimidin
Nukleotidlər — RNT-də	Adenilat	Quanilat	Sitidilat	Uradilat
Nukleotidlər — DNT-də	Dezoksiadenilat	Dezoksiquanilat	Dezoksisititidilat	Dezoksiuradilat
Nukleozid monofosfatlar	AMP	GMP	CMP	UMP
Nukleozid difosfatlar	ADP	GDP	CDP	UDP
Nukleozid trifosfatlar	ATP	GTP	CTP	UTP
Dezoksinukleosid mono-, di- və trifosfatlar	dAMP və sair	dGMP və sair	dCMP və sair	dTMP və sair



ŞƏKİL 2-18 Heksozaların kimyəvi quruluşları. Bütün heksozalar eyni sxematik formulaya malikdirlər ($C_2H_{12}O_6$) və quruluşuna aldehid və ya keton qrupu daxildir. (a) **D**-qlükozanın həlqəvi forması xətti molekuldan 1-ci karbondakı aldehid qrupunun 5-ci və ya 4-ü karbondakı hidroksil qrupu ilə reaksiyası nəticəsində yaranır. Üç forma asanlıqla bir-birinə çevrilə bilir, hərçənd ki, piranoza forması (*sağda*) bioloji sistemlərdə dominantlıq edir. (b) **D**-mannozada və **D**-qalaktozada eyni karbona birləşmiş H (yaşıl) və OH (mavi) konfiqurasiyası qlükozadakılardan fərqlənir. Bu şəkərlər qlükoza kimi ilkin olaraq piranozalar (altı-guşəli həlqə) kimi mövcud olurlar.

Polisaxaridlər daxilində monosaxaridləri birləşdirərək qlikozid əlaqəsini yaradan fermentlər bir şəkərin α və ya β anomerlərinə, başqasının isə xüsusi hidroksil qrupuna spesifik olur. Prinsipcə istənilən iki şəkər molekulu, müxtəlif yollarla birləşə bilərlər, çünki hər iki monosaxarid qlikozid əlaqələrinin yaranmasında iştirak edə bilən çoxsaylı hidroksil qrupuna malikdir. Bundan başqa, istənilən bir monosaxarid ikidən artıq başqa monosaxaridə birləşmə potensialına malikdir, beləliklə şaxələnmə nöqtəsini və qeyri-xətti polimerləşməni əmələ gətirir. Qlikozid əlaqələri adətən böyüməkdə (uzunamaqda) olan polisaxarid zənciri ilə monosaxaridin kovalent modifikasiya olunmuş forması arasında formalaşır. Belə modifikasiyalara fosfat (məsələn, qlükoza-6 fosfat) və ya nukleotid (məsələn, UDP-qalaktoza) daxildir:

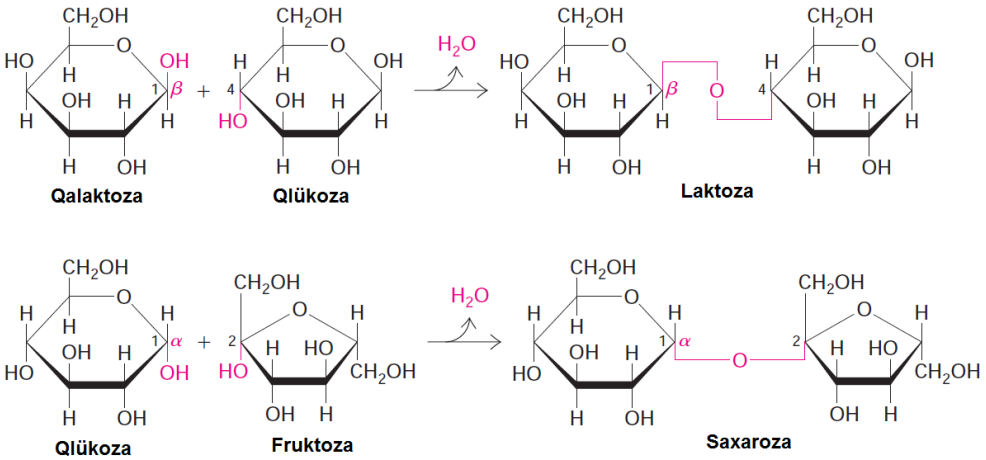


Müxtəlif monosaxaridləri bir-birinə çevirən epimeraza fermenti tez-tez hallarda modifikasiya olunmamış şəkərlərdən deyil, nukleotid şəkərlərdən istifadə edir.

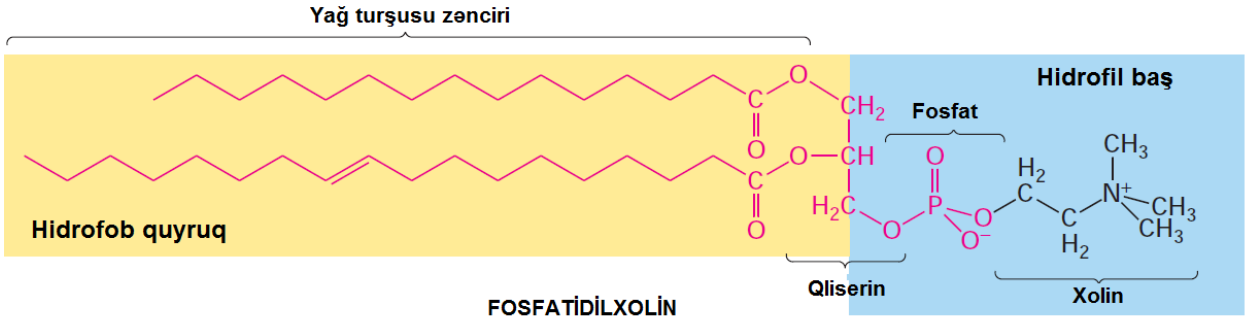
Çoxsaylı mürəkkəb polisaxaridlər müxtəlif kiçik qruplarla, xüsusən amin, silfat və asetil qurupları ilə kovalent əlaqədə olan modifikasiya olunmuş şəkərlərə malik olurlar. Bu cür modifikasiyalar, Fəsil 19-da müzakirə olunan hüceyrəxarici matrisanın əsas polisaxarid komponenti olan **qlikozaminoqlikanlarda** daha zəngindir.

Biomembranların Ikiqat Quruluşunu Yaratmaq Üçün Fosfolipidlər Qeyri-kovalent Birləşirlər

Biomembranlar ikilaylı və ya ikiqatlı quruluşa malik olan böyük, tezuyuşan vərəqlərdir. Onlar hüceyrələrin və onların hüceyrədaxili orqanoidlərininin hüdudları rolunu oynayır və bəzi viruslarda onların xarici səthini yaradır. Membranlar nəyin hüceyrə olmasını (xarici membran və membranın daxilindəkilər) və nəyin hüceyrə olmadığını (hüceyrələrdən xaricdə hüceyrələrarası boşluq) tamamilə müəyyən edə bilir. Zülallardan, nuklein turşularından və polisaxaridlərdən fərqli olaraq membranlar onları təşkil edən monomer komponentlərin *qeyri-kovalent* assosasiyası nəticəsində yaranır. Biomembranların əsas quruluş blokları **fosfolipidlərdir**, onların fiziki xüsusiyyəti membranların vərəqşəkilli ikiqat formasının yaranmasını təmin edir. Fosfolipidlərdən başqa, biomembranlara başqa müxtəlif molekullar da, o cümlədən, xolesterin, qlikolipidlər və zülallar da daxil olurlar. Biomembranların quruluşu və funksiyası Fəsil 7-də ətraflı şəkildə müzakirə olunacaq. Burada biz diqqətimizi biomembranlardakı fosfolipidlərdə cəmləyəcəyik.



ŞƏKİL 2-19 Laktoza və saxaroza disaxaridlərinin formalaşması. İstənilən qlikozid əlaqələrində bir şəkər molekulunun anomer karbonu (istər α və istəsə də β konformasiyalar) başqa şəkər molekulunun hidroksil qurupunun hidrogeni ilə əlaqəyə girir. Əlaqələr uyğun olaraq adlandırılır, belə ki, laktoza β (1→4) əlaqəsinə malikdir və saxaroza α (1→2) əlaqəsinə malikdir.



ŞƏKİL 2-20 Tipik fosfoqliserid fosfatidilxolin. Fosfoqliseridlər hidrofob quyruğa (sarı) və hidrofil başa (mavi) malik olan amfipatik fosfolipidlərdir və qliserin fosfat qurupu vasitəsi ilə spirtə birləşir. Fosfoqliseriddə yağ turşusu yan zəncirinin biri və ya hər ikisi doymuş və ya doymamış ola bilər. Sadə fosfolipiddə fosfat turşusunda (qırmızı) fosfat spirtə birləşmir.

CƏDVƏL 2-4 Fosfolipidlərdə Çox Yayılmış Yağ Turşuları

Turşunun ümumi adı (mötərizədə ionlaşan forma)	Qısaltma	Kimyəfi formula
Doymuş yağ turşuları		
Miristin (miristat)	C14:0	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$
Palmitin (palmitat)	C16:0	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$
Stearin İstearat)	C18:0	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$
Doymamış yağ turşuları		
Olein (oleat)	C18:1	$CH_3(CH_2)_7$-CH=CH-$(CH_2)_7$-COOH
Linolen (linolat)	C18:2	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7$-COOH
Araxidon (araxidonat)	C20:4	$CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_3CH=CH(CH_2)_3$-COOH

Fosfolipidlərin quruluşunu anlamaq üçün biz onların hər bir komponent hissələrini və onların necə yığıldığını anlamalıyıq. Tezliklə biz görəcəyik ki, fosfolipidlər iki uzun zəncirdən, yüksək dərəcədə polyar kiçik qruplarla, o cümlədən fosfat və kiçik üzvi molekullarla, məsələn qliserinlə (trihidroksipropanol) birləşmiş (adətən efir əlaqələri ilə) qeyri-polyar yağ turşusu qruplarından təşkil olunublar (Şəkil 2-20).

Yağ turşuları karboksil qrupuna (-COOH) birləşmiş karbohidrogen zəncirindən təşkil olunmuşlar. Qlükoza kimi yağ turşuları da çox hüceyrələr üçün əhəmiyyətli enerji mənbəyidir (bax Fəsil 12). Onlar uzunluqlarına görə fərqlənirlər, hərçənd ki, hüceyrələrdə üstünlük (çoxluq) təşkil edən yağ turşuları cüt sayda, adətən 14, 16, 18, və ya 20 karbon atomlarına malikdirlər. Fosfolipidlərdə olan əsas yağ turşularının siyahısı Cədvəl 2-4-də verilmişdir. Yağ turşuları adətən çox hallarda qısaltmalarla işarə olunurlar C*x*:*y*, burada ***x*** zəncirdəki karbonların sayıdır, ***y*** ikiqat rabitələrin sayıdır. 12 və daha artıq karbon atomuna malik olan yağ turşusuları onlardakı uzun hidrofob karbohidrogen zəncirinə görə demək olar ki, su məhlullarında həll olmurlar.

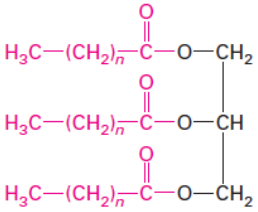
Bütün karbon-karbon əlaqələri birqat rabitədən ibarət olan yağ turşuları, yəni onlarda ikiqat rabitə yoxdur, onlara **doymuş** yağ turşuları deyilir; o turşular hansı ki, ən azı bir ikiqat karbon-karbon əlaqəsinə malikdir onlara **doymamış** yağ turşuları deyilir. Birdən artıq ikiqat karbon-karbon əlaqəsinə malik olan doymamış yağ turşuları **polidoymamış (polyunsaturated)** yağ turşuları adlanır. İki əhəmiyyətli polidoymamış yağ turşuları, linoley (C18:2) və linolen (C18:3) turşuları məməlilərdə sintez oluna bilmirlər, ona görə də onların qidalarında təmin olunmalıdırlar. Məməlilər başqa çox istifadə olunan yağ turşularını sintez edə bilirlər.

Fosfolipidlərdə yağ turşuları dehidrasiya reaksiyasının başqa tipi, esterifikasiya reaksiyası ilə kovalent rabitə ilə başqa molekula birləşmişlər. Bu zaman yağ turşusunun karboksil qrupundakı OH və başqa molekulun karboksil qrupundakı H itirilir. Bu reaksiya zamanı kombinasiya olunmuş molekulda yağ turşusundan törənmiş hissə *asil qrupu* və ya *yağ turşusu asil qrupu* adlanır. Bu quruluş fosfolipidlərin daha çox yayılmış forması ilə, **fosfoqliseridlərlə** təsvir olunur, bunlar qliserinin üç karboksil qrupundan ikisinə birləşmiş iki asil qrupuna malikdirlər (bax Şəkil 2-20).

Fosfoqliseridlərdə qliserinin karboksil qrupunun biri fosfatla efirləşdiyi halda, digər ikisi yağ turşuları ilə efirləşir. Sadə fosfolipid, fosfatid turşusu yalnız bu komponentlərə malikdir. Fosfatid turşusu kimi fosfolipidlər membranın yalnız quruluş blokları deyillər, onlar həmçinin əhəmiyyətli siqnal molekullarıdır. İkinci mövqedə olan (qliserinin orta karbonundakı karboksil qrupuna birləşmiş) asil zənciri atılmış lizofosfatid turşusu nisbətən suda həllolandır və hüceyrə bölünməsinin güclü induksiya edicisi (mitogen adlanan) ola bilər. Membranlarda tapılmış fosfolipidlərin əksəriyyətində fosfat qrupu həmçinin başqa hidrofil birləşmədəki hidroksil qrupu ilə efirləşir. Məsələn, fosfatidilxolində xolin fosfata birləşmişdir (bax Şəkil 2-20). Fosfatdakı mənfi yük, eləcə də ounla efirləşən yüklənmiş və ya polyar qruplar su ilə möhkəm qarşılıqlı təsir yarada bilirlər. Fosfat və onunla birləşən efirləşmiş qrup olan fosfolipidlərin "baş" qrupu hidrofildir, halbuki yağ turşusu asil zəncirləri, "quyruqlar" hidrofobdurlar. Digər sadə fosfoqliseridlər və onlara birləşən "baş" qruplar Cədvəl 2-5-də göstərilmişdir. Həm hidrofob, həm də hidrofil rayonlara malik olan fosfolipid kimi molekullar **amfipatik**

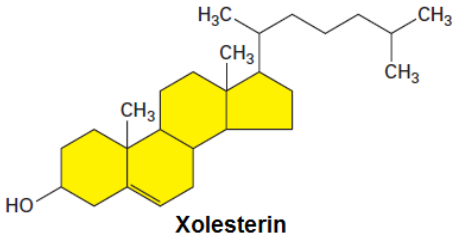
adlandırılır. Fəsil 7-də biz görəcəyik ki, osfolipidlərin amfipatik xassəsi biomembranlarda fosfolipidlərin necə vərəqə bənzər qatlarda birləşmələrini təmin edir, bu zaman yağ turşusu quyruqları vərəqin mərkəzinə doğru istiqamətlənmişdir, baş qruplar isə vərəqin xaricinə, su mühitinə doğru yönəlmişdir (bax Şəkil 2-13).

Yağ asil qrupları həmçinin başqa yağ molekullarına, o cümlədən qliserinə efir rabitə ilə birləşmiş üç asil qrupuna malik olan **triasilqliserollara** və ya t**riqliseroidlərə** kovalent birləşə bilirlər:



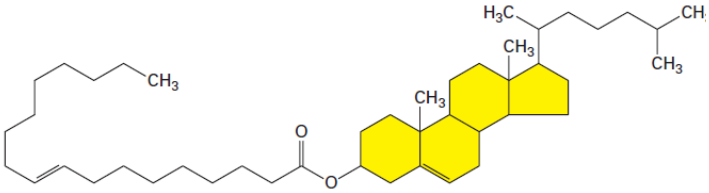
Triasilqliserol

Onlar həmçinin kovalent rabitə ilə çox hidrofob molekul olan xolesterinə, spirtə birləşərək xolesterin efiri əmələ gətirirlər.



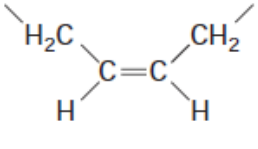
Xolesterin

Triqliseridlər və xolesterin efirləri tamamilə suda həllolmayan molekullardır və bunlarda yağ turşuları və xolesterin ehtiyat saxlanılır və ya daşınır. Triqliseridlər piy toxumalarının piy hüceyrələrində yağ turşularının saxlanma formasıdır və qidalanma piyinin əsas komponentidir. Xolesterin efirləri və triasilqliseridlər qan dövranı ilə lipozülallar adlanan xüsusi daşıyıcılar vasitəsilə toxumalar arasında daşınır (bax Fəsil 14).

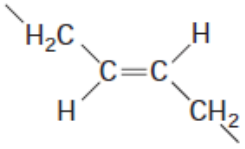


Xolesterin efiri

Biz yuxarıda gördük ki, fosfolipidləri (həm fosfoqliseridləri, həm də triqliseridləri) əmələ gətirən yağ turşuları doymuş və ya doymamış ola bilirlər. Karbon-karbon ikiqat rabitəsinin (C=C) doymamış yağ turşularında vacib əhəmiyyəti ondan ibarətdir ki, bu ikiqat rabitənin hər birinin ətrafında iki stereoizomer konformasiya, *cis* və *trans* mümkündür:



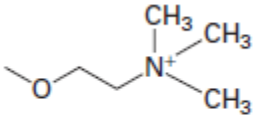
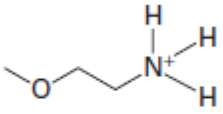
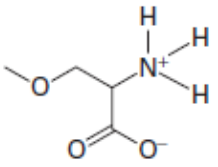
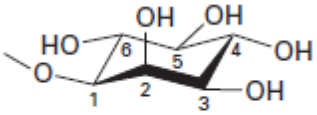
Cis

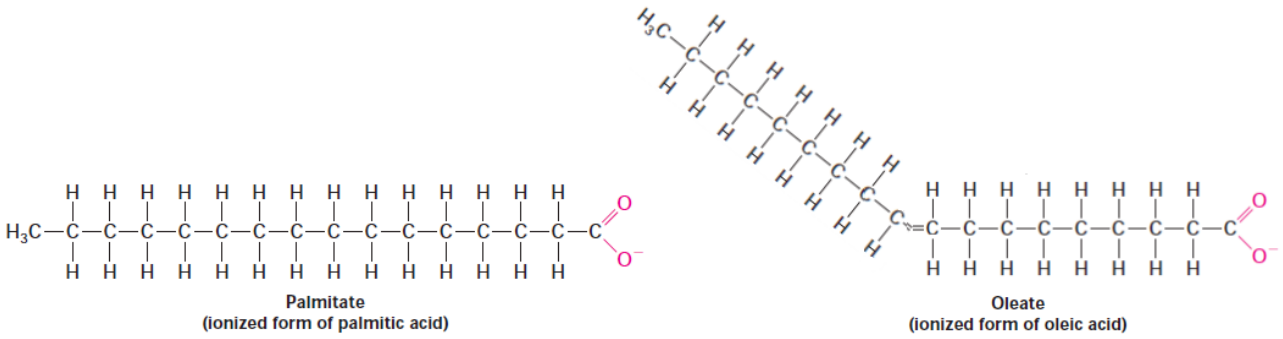


Trans

cis ikiqat rabitə, doymuş yağ turşusunda başqa cür dəyişkən düz asil zəncirində sərt ilgək əmələ gətirir (Şəkil 2-21). Ümumiyyətlə, bioloji sistemlərdə doymamış yağ turşuları yalnız *cis* ikiqat rabitəyə malik olurlar. İlgəyi olmayan doymuş yağ turşuları çox sıx şəkildə bir yerə bükülürlər, ona görə də doymamış yağ turşuları ilə müqayisədə daha yüksək ərimə temperaturuna malikdirlər. Kərə yağında əsas yağ molekulları doymuş yağ turşusu asil zənciri olan triqliseridlərdir, ona görədir ki, kərə yağı otaq temperaturunda bərk olur. *Cis* ikiqat rabitə ilgəyinə malik olan doymamış yağ turşuları və ya yağ asil zənciri yağ turşusu asil zəncirləri kimi sıx şəkildə bir yerə bükülə bilmirlər. Beləliklə, doymamış yağ turşuları olan triqliseridlərdən təşkil olunmuş bitki yağları adətən otaq temperaturunda maye olurlar. Bitki yağları və buna bənzər olanlar qismən hidrogenləşərək bəzi doymamış yağ asil zəncirindən doymuş yağ asil zəncirinə keçirlər. Nəticədə, hidrogenləşmiş bitki yağı bərk marqarinə çevrilə bilir. Hidrogenləşdirmə reaksiyasının əlavə (yan) məhsulları bəzi yağ asil zəncirlərinin trans yağ turşularına çevrilməsidir, buna da"trans piylər" deyilir. "Trans piylər" qismən hidrogenləşmiş marqarinlərdən başqa təbii olmayan digər ərzaq məhsullarında da tapılır. Doymuş və trans yağ turşuları oxşar fiziki xüsusiyyətə malikdirlər, məsələn, hər ikisi otaq temperaturunda bərk olmağa meyillidirlər. Onların istifadəsi doymamış yağ turşularının istifadəsi ilə müqayisədə plazmada xolesterinin miqdarının artmasına səbəb olur, dieta mütəxəssisləri tərəfindən məsləhət görülmür.

CƏDVƏL 2-5 Ümumi Fosfoqliseridlər və Baş Qruplar

Ümumi fosfoqliseridlər	Baş qruplar
Fosfatidilxolin	 **Choline**
Fosfatidiletanolamin	 **Ethanolamine**
Fosfatidilserin	 **Serine**
Fosfatidilinozitol	 **Inositol**



ŞƏKİL 2-21 İkiqat rabitənin yağ turşusunun formasına təsiri. Göstərilənlər 16 C atomlu doymuş yağ turşusu palmitin turşusunun və 18 C atomlu doymamış yağ turşusu olein turşusunun kimyəvi quruluşudur. Doymuş yağ turşularında karbohidrogen zənciri çox vaxt xətti olur; oleatdakı ***cis*** ikiqat əlaqə karbohidrogen zəncirində sərt əyri əmələ gətirir [Strayerə görə L.Stryer, 1994, Biochemistry, 4th ed., W.H.Freeman and Company, p.265.

2.2 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Hüceyrənin Kimyəvi Quruluş Blokları

- Makromolekullar dehidrasiya reaksiyaları vasitəsi ilə monomer subvahidlərin kovalent rabitə ilə birləşməsi nəticəsində yaranmış polimerlərdir. Hüceyrədə üç tip makromolekullar tapılmışdır: zülallar, peptid rabitəsi ilə birləşmiş aminturşularından təşkil olunmuşdur; nuklein turşuları, fosfodiefir əlaqələri ilə birləşmiş nukleotidlərdən təşkil olunmuşlar; və polisaxaridlər, qlikozid əlaqələri ilə birləşmiş monosaxaridlərdən (şəkərlərdən) təşkil olunmuşlar (bax Şəkil 2-13). Dördüncü əsas kimyəvi quruluş bloku fosfolipidlər biomembranlarda qeyri-kovalent rabitə ilə birləşirlər.
- 20 ümumi istifadə olunan amin turşularının yan zəncirlərinin ölçüsünə, formasına, yükünə, hidrofobluğuna və fəallığına görə fərqləri zülalların quruluş və kimyəvi xüsusiyyətlərini təyin edir (bax Şəkil 2-14). Yan zəncirlərin ayrıldığı üç əsas kateqoriyalar hidrofobluq, hidrofillik (əsas, turşu və polyar) və xüsusi kateqoriyalardır (bax Şəkil 2-14). Amin turşularının bu kateqoriyadan hansına aid olmasının yadda saxlanılması çox vacibdir.
- DNT və RNT-ni təşkil edən nukleotidlərdə əsaslar pentoza şəkərinə birləşmiş karbon- və azotdan-təşkil olunan həlqədən ibarətdirlər. Onlar iki qrupu təşkil edirlər: purinlər – adenin (A) və quanin (G); pirimidinlər – sitozin (C), timin (T) və urasil (U) (bax Şəkil 2-17). A, G, T və C DNT-də tapılmışlar, A, G, U və C isə RNT-də tapılmışlar.
- Qlükoza və başqa heksozalar üç formada mövcud olurlar: açıq zəncirdə olan xətti quruluş, altıguşəli (piranoza) həlqəsi və beşguşəli (furanoza) həlqəsi (bax Şəkil 2-18). Bioloji sistemlərdə piranoza forması, **D**-qlükoza çoxluq təşkil edir.
- Eyni şəkərin istər α, istərsə də β anomeri ilə başqa şəkərin hidroksil qrupu arasında yaranan qlikozid əlaqələri disaxaridlərin və başqa polisaxaridlərin yaranmasına səbəb olur (bax 2-19).
- Fosfolipidlər hidrofob quyruğun (çox hallarda iki yağ asil zənciri) kiçik üzvi molekullarla (çox hallarda qliserin) hidrofil başa birləşdiyi amfipatik molekullardır (bax Şəkil 2-20).
- Yağ turşularının uzun karbohidrogen zənciri doymuş halda (ikiqat karbon-karbon əlaqəsinə malik olmayanlar) doymamış (bir və ya daha artıq ikiqat rabitəyə malik olan) halda ola bilirlər. Yağlar, məsələn kərə yağı əsasən doymuş yağ asil zəncirlərindən təşkil olunduğundan otaq temperaturunda bərk olmağa meyillidirlər, halbuki *cis* ikiqat rabitəsinə malik olan doymamış yağlar çox sıx şəkildə bir yerə bükülə bilməyən ilgəkli zəncirlərə malikdirlər və ona görə də otaq temperaturunda maye kimi olmağa meyillidirlər.

2.3 Kimyəvi Reaksiyalar və Kimyəvi Tarazlıq

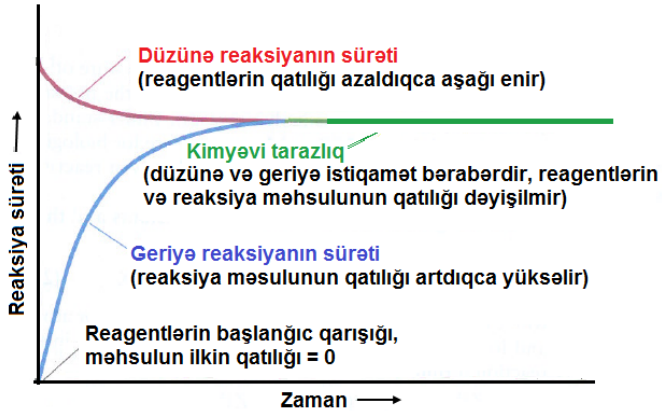
İndi biz müzakirələrimizi rəbitələrin, əsasən də reaksiyaya girən kimyəvi *reagentlərdəki* kovalent rabitələrin qırıldığı və reaksiya *məhsullarını* yaratmaq üçün yeni rabitələrin yarandığı kimyəvi reaksiyalara keçirik. İstənilən bir zaman müddətində hər bir hüceyrədə eyni zamanda yüzlərlə müxtəlif kimyəvi reaksiyalar baş verir və prinsipcə çox kimyəvi maddələr müxtəlif kimyəvi raeksiyalara qoşula bilir. Reaksiyanın davam etdiyi müddəti və reaksiyanın baş verdiyi getmə sürəti hüceyrələrin kimyəvi tərkibini müəyyən edir. Bu konsepsiyalar bu dərslik boyu yenidən təkrar-təkrar meydana çıxacaq, ona tgörə də sizin onlarla tanış olmağınız çox vacibdir. Bu bölmədə, biz tarazlıq və davamlılıq vəziyyəti konsepsiyalarını və eləvə də dissosasiya konstantlarını və pH-ı müzakirə edirik. 2.4 bölmədə, biz enerjinin kimyəvi reaksiyanın dərəcəsinə və sürətinə necə təsir etdiyini müzakirə edirik.

Düzünə və Geriyə Reaksiyaların Sürəti Bərabər Olanda Kimyəvi Reaksiyalar Tarazlıqda Olur

Reagentlər ilk əvvəl bir yerə qarışdırılanda heç bir reaksiya məhsulu yaranmamışdan, düzünə reaksiyanın reaksiya məhsulunu əmələgətirmə sürəti qismən reagentlərin bir-birinə qarışması və reaksiyanın getməsi ehtimalını müəyyən edən reaksiyaya girən maddələrin ilkin qatılıqları ilə təyin edilir (Şəkil 2-22). Reaksiya məhsulu toplandıqca hər bir reagentin miqdarı azalır, beləliklə düzünə reaksiyanın sürəti aşağı düşür. Bu zaman bəzi reaksiya məhsulu molekulları geriyə reaksiyada

iştirak etməyə başlayır və yenidən reagentləri əmələ gətirir. Reaksiyanın "geriyə istiqamətdə" getməsi qabliyyəti *mikroskopik geriyədönmə* adlanır. Başlanğıcda geriyə reaksiyanın sürəti zəif olur, amma reaksiya məhsulunun qatılığı artdıqca o da yüksəlir. Nəhayət, tədricən sonda düzünə və geriyə reaksiyaların sürəti bərabərləşir, beləliklə reagentlərin və reaksiya məhsulunun qatılıqlarının dəyişilməsi dayanır. Belə olan hala sistemin **kimyəvi tarazlıq** vəziyyəti deyilir.

Reaksiya məhsullarının qatılığının reagentlərin qatılıqlarına olan nisbəti onlar **tarazlıq sabiti** (K_{eq}) adlı tarazlığa çatanda sabit qiymətdir. Beləliklə, K_{eq} reaksiyanın tarazlığa çatdığı anda baş verdiyi ölçü dərəcəsini təmin edir. Kimyəvi reaksiyanın sürəti katalizlə artırıla bilər, amma katalizator tarazlıq konstantını dəyişmir (bax Bölmə 2.4). Katalizator kovalent rabitənin yaranmasını və qırılmasını sürətləndirir, amma özü reaksiya zamanı həmişəlik dəyişikliyə uğramır.



ŞƏKİL 2-22 Kimyəvi reaksiyaların sürətinin zamandan asılılığı. Reaksiyanın düzünə və əksinə getmə sürəti reagentlərin və reaksiya məhsulunun ilkin qatılığından asılıdır. Xalis düzünə reaksiya sürəti reagentlərin qatılığı azaldıqca aşağı enir, halbuki reaksiya məhsulunun miqdarı artdığından xalis geriyə reaksiya sürəti yüksəlir. Tarazlıqda düzünə və geriyə reaksiyalar bərabər olur, reagentlərin və reaksiya məhsulunun qatılığı sabit (konstant) qalır.

Tarazlıq Konstantı Kimyəvi Reaksiya Dərəcəsini Əks Etdirir

İstənilən kimyəvi reaksiya üçün K_{eq} reagentlərin və reaksiya məhsulunun təbiətindən, temperaturdan və təzyiqdən (xüsusən də reaksiya daxil olan qazlarda) asılıdır. Standart fiziki şəraitdə (bioloji sistemlər üçün 25ºC və 1 atm təzyiqdə) K_{eq} verilmiş reaksiya üçün katalizator olsa da, olmasa da həmişə eynidir.

Üç reagentlə və üç reaksiya məhsulu ilə olan ümumi reaksiya üçün

$$aA + bB + cC \leftrightarrow zZ + yY + xX \qquad (2\text{-}1)$$

burada böyük hərflər xüsusi molekulları və ya atomları təmsil edir, kiçik hərflər isə reaksiya formulasında olan hər bir rəqəmi təmsil edir; tarazlıq konstantı aşağıdakı formula ilə verilir:

$$K_{eq} = \frac{[X]^x[Y]^y[Z]^z}{[A]^a[B]^b[C]^c} \qquad (2\text{-}2)$$

Burada mötərizə molekulların qatılığını göstərir. 2-2 bərabərliyində reagentlərin və reaksiya məhsullarının qatılığı tarazlıqda təmsil olunmuşdur. Düzünə reaksiyanın (2-1 tənlikdə soldan sağa) sürəti aşağıdakı kimi olacaq:

$$\textbf{Sürət}_{\textbf{düzünə}} = k_f[A]^a[B]^b[C]^c$$

burada k_f düzünə gedən reaksiyanın sürət konstantıdır. Buna oxşar olaraq, geriyə reaksiyanın sürəti (2-1 tənlikdə sağdan sola) belə olacaq:

$$\textbf{Sürət}_{\textbf{geriyə}} = k_f[X]^x[Y]^y[Z]^z$$

burada k_f əksinə gedən reaksiyanın sürət konstantıdır. Reaksiya sürətinin bu tənliyi reaksiyanın tarazlığa çatıb çatmamasından asılı olmayaraq tətbiq oluna bilir. Xatırlamaq vacibdir ki, reaksiyanın düz və geriyə sürəti reagentlərin və ya reaksiya məhsulunun qatılığının dəyişilməsi ilə dəyişə bilər, eyni zamanda düzünə və geriyə reaksiya sürətinin konstantı dəyişmir, buradan da "konstant" adlandırılması götürülmüşdür. Reaksiya sürətini və sürət konstantını dəyişik salmaq ümumi xətadır. Tarazlıqda düzünə və geriyə reaksiyaların sürəti bərabərdir, beləliklə $\textbf{Sürət}_{\textbf{düzünə}}$/ $\textbf{Sürət}_{\textbf{geriyə}} = \mathbf{1}$. Bu bərabərliyi yenidən qurmaqla biz tarazlıq konstantını sürət konstatntı nisbəti kimi ifadə edə bilərik:

$$K_{eq} = \frac{k_f}{k_r} \qquad (2\text{-}3)$$

K_{eq} konsepsiya kimyəvi reaksiya baş verən zaman ayrılan və ya udulan enerji barədə düşünərkən xüsusən əhəmiyyətlidir. Biz bunu bölmə 2.4-də kifayət qədər ətraflı müzakirə edəcəyik.

Hüceyrələrdə Kimyəvi Reaksiyalar Sabit Vəziyyətdə Olur

Müvafiq şərait altında və kifayət qədər zaman müddətində sınaq tyubunda aparılmış tək bir biokimyəvi reaksiya müəyyən vaxtdan sonra sonda tarazlığa çatır, bu zaman reagentlərin və məhsulun qatılığı zamandan asılı olaraq dəyişilmir, çünki artıq düzünə və geriyə reaksiyaların sürəti bərabərdir. Amma hüceyrə daxilindəki çox reaksiyalar metabolik yollarla bağlıdır, bu zaman reaksiyanın məhsulu alternativ müqəddarata, sadəcə olaraq geriyə reaksiya ilə reagentlərə çevrilmir və sonda tarazlığa çatmır. Məsələn, bir reaksiyanın məhsulu başqa bir reaksiyada reagent rolunu oynaya bilər və ya hüceyrədən kənara çıxarıla bilər. Bu cür daha mürəkkəb vəziyyətdə ikin (orjinal) reaksiya heç vaxt tarazlığa çata bilmir, çünki reaksiya məhsullarından bəzilərinin geriyə ilkin reagentlərə çevrilmək imkanı olmur. Bununla belə, bu cür qeyri-tarazlıq şəraitində maddənin formalaşması sürəti onun istifadə olunması sürətinə bərabər ola bilər və nəticədə maddənin qatılığı uzun zaman müddətində sabit (konstant) qalır. Bu cür vəziyyətdə bu maddəni istehsal edən və istifadə edən bir-biri ilə əlaqəli reaksiyalar sisteminə davamlı vəziyyətdə olduğu deyilir (Şəkil 2-23). Bu cür əlaqəli reaksiyaların bir nəticəsi odur ki, onlar aralıq məhsulların çox toplanmasına mane olurlar və hüceyrəni aralıq məhsulların yüksək qatılıqda olan zəhərli təsirindən mühafizə edirlər. Hazırda davam edən reaksiyada reaksiya məhsulunun qatılığı uzun müddət dəyişilməyəndə o tarazlıq vəziyyətinin nəticəsi ola bilər və ya o sabit vəziyyətin nəticəsi ola bilər. Bioloji sistemlərdə metabolit qatılığı, məsələn: qanda qlükozanın səviyyəsi zamanla dəyişilmirsə - bu şərait homeostazis adlanır – bu tarazlığın deyil sabit vəziyyətin nəticəsidir.

ŞƏKİL 2-23 Sabit vəziyyətdə və tarazlıqda reaksiyaların müqayisəsi. (a) Sınaq tyubunda biokimyəvi reaksiya (A→B) müəyyən zamndan sonra tarazlığa çatacaq, bu zaman irəliyə və geriyə reaksiyanın sürəti bərabər olacaq (reaksiya oxlarının bərabər uzunluğu ilə göstərildiyi kimi). (b) Hüceyrə daxilində metabolik yollarda B məhsulu adətən bu nümunədə C məhsuluna çevrilməklə istifadə olunacaq. Əlaqəli reaksiyalar yolu aralıq məhsulun (məsələn, burada B) formalaşması sürəti onun istifadə olunma sürətinə bərabər olan zaman sabit vəziyyətdədir. Oxların qeyri-bərabər uzunluqda göstərildiyi kimi, metabolik yolu təşkil edən, fərdi geriyə dönən reaksiyalar tarazlığa çatmır. Bundan əlavə, sabit vəziyyətdə aralıq məhsulların qatılığı onların tarazlıq vəziyyətində ola biləcəyindən fərqlənə bilər.

Birləşmə Reaksiyalarının Dissosasiya Konstantı Qarşılıqlı Təsirdə Olan Molekulların Affinliyində Əks Olunur

Tarazlıq konsepsiyası molekulun heç birində kovalent dəyişiklik baş vermədən bir molekulun başqasına birləşməsi zamanı da tətbiq oluna bilir. Yuxarıda müzakirə olunduğu kimi, kovalent rabitədən daha çox qeyri-kovalent qarşılıqlı əlaqələrin əmələ gəlməsi və ya qırılması kimi proseslərin daxil olduğu çoxsaylı hüceyrə prosesləri bu cür birləşmə "reaksiyalarından" asılıdır. Buna ümumi nümunə kimi, hüceyrədaxili siqnal yolunu başlayan (Fəsil 15) **liqandların** (məsələn, insulin və ya adrenalin hormonu) hüceyrə səthində **reseptorlara** birləşməsini göstərmək olar. Başqa bir nümunə zülalın DNT molekulundakı əsas cütlərinin xüsusi ardıcıllığına birləşməsidir, çox zaman bu yaxınlıqda yerləşən genin ekspressiyasını artırır və ya azaldır (bax Fəsil 9). Əgər birləşmə reaksiyası üçün tarazlıq konstantı məlumdursa əmələ gəlmiş kompleksin stabilliyi proqnozlaşdırıla bilər.

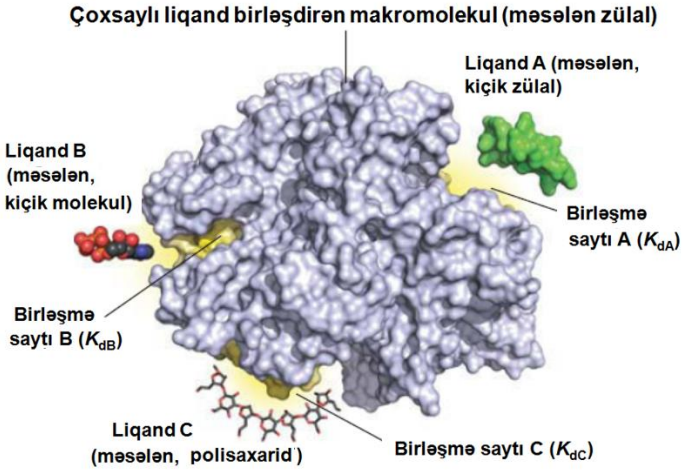
Qeyri-kovalent əlaqə ilə birləşmiş kompleksin qatılığının təyin edilməsində istifadə olunan ümumi yanaşmanı təsvir etmək üçün biz zülalın (P) zülal-DNT kompleksi (PD) yaratmaq üçün DNT-yə (D) birləşmə dərəcəsini hesablayacağıq:

$$P + D \rightleftharpoons PD$$

Ən çox yayılmış birləşmə reaksiyaları, **dissosasiya konstantı** K_d baxımından təsvir olunmuşlar, bu tarazlıq konstantının qarşılıqlı əksidir. Bu birləşmə reaksiyası üçün dissosasiya konstantı aşağıdakı formula ilə reaksiyada iştirak edən üç komponentin tarazlıqda olan zaman qatılığından hesablanırr:

$$K_d = \frac{[P][D]}{[PD]} \qquad (2\text{-}4)$$

Onu qeyd etmək lazımdır ki, bu cür birləşmə reaksiyasında DNT-nin yarısı zülala birləşərkən ([PD] = [D]), P-in qatılığı K_d-ə bərabər olur. K_d aşağı olduqca D-in yarısını birləşdirmək üçün o qədər də aşağı qatılıqda P tələb olunur. Başqa sözlə, K_d aşağı olduqca P daha sıx şəkildə D-yə birləşir (affinlik yüksək olur).



ŞƏKİL 2-24 Makromolekullar çoxsaylı liqandlar üçün müxtəlif birləşmə saytlarına malik ola bilirlər. Böyük makromolekul (məsələn, zülal, mavi) üç müxtəlif birləşmə saytları (A – C) ilə göstərilmişdir, hər bir birləşmə saytı müxtəlif dissosasiya konstantı ilə (K_{dA-C}) üç müxtəlif birləşmə partnyorlarına (A – C liqandları) molekulyar komplementarlıq nümayiş etdirir.

Adətən zülalın DNT-nin xüsusi ardıcıllığına birlişdiyi reaksiyanın K_d qiyməti 10^{-10} M olur, burada M molyarlıq işarəsidir və ya bir litrdəki mol (mol/L) göstərir. Bu dissosasiya konstantının qiymətini hüceyrədaxili birləşmiş DNT-nin birləşməmiş DNT-yə nisbətinə uyğunlaşdırmaq üçün sadə bir misala baxaq, hesab edək ki, bakterial hüceyrə 1.5×10^{-15} L həcmə malikdir və onun bir molekul DNT və 10 molekul DNT-birləşdirən P zülalı var. Bu halda verilmiş 10^{-10} M-a bərabər olan K_d və hüceyrədə P-nin ümumi qatılığına ($\sim 111 \times 10^{-10}$ M, təxminən K_d-dən 100 dəfə çoxdur) əsasən hətta hüceyrələr cəmisi 10 zülal molekuluna malik olsa da zamanın 99 faizində spesifik DNT ardıcıllığı zülal molekulu ona birləşmiş vəziyyətdə olur və zamanın 1 faizində o zülalla birləşməmiş vəziyyətdə olur. Aydındır ki, P və D bir-birinə qarşı yüksək affinliyə malikdirlər və onların birləşmə reaksiyasında dissosasiya konstantının aşağı qiyməti ilə əks olunduğu kimi sıx şəkildə birləşirlər. Zülal-zülal və zülal-DNT birləşmələri üçün K_d qiyməti $\sim10^{-9}$ M (nanomolyar) olanda möhkəm, $\sim10^{-6}$ M (mikromolyar) olanda orta möhkəm və $\sim10^{-3}$ M (millimolyar) olanda nisbətən zəif hesab olunur.

Zülal kimi böyük bioloji makromolekullar eyni zamanda bir neçə molekulu birləşdirmək üçün çoxsaylı birləşmə səthlərinə malik ola bilirlər (Şəkil 2-24). Bəzi hallarda bu birləşmə reaksiyaları onların özlərinin bir-birindən asılı olmayan fərqli konstant K_d qiymətlərindən asılı olmurlar. Başqa hallarda molekulun makromolekuldakı bir sayta birləşməsi uzaqdakı saytın üçölçülü formasını dəyişə bilir və beləliklə həmin uzaqdakı saytın bəzi başqa molekullarla birləşməsi üçün qarşılıqlı təsirini dəyişir. Amin turşularının yan zəncirinin yuxarıda qeyd olunan modifikasiyası çox zaman belə birləşmə reaksiyaları üçün tələb olunan molekulyar formanın alınmasına kömək edir. Bu kovalent və qeyri-kovalent birləşmə reaksiyaları

bir molekulun başqa molekulun quruluşunu və birləşmə fəallığını dəyişərək onu tənzimləməsi baxımından çox əhəmiyyətli mexanizmdir. Bu tənzimləmə mexanizmini biz Fəsil 3-də ətraflı şəkildə öyrənirik.

Bioloji Məhlullar Xarakterik pH Qiymətinə Malikdirlər

Hüceyrə daxilindəki həlledici və bütün hüceyrəxarici mühitdəki maye sudur. İstənilən su məhlulunun əhəmiyyətli xassəsi müsbət yüklənmiş hidrogen ionlarının (H^+) və mənfi yüklənmiş hidroksil (OH^-) ionlarının qatılığıdır. Çünki bu ionlar H_2O-un dissosasiya məhsulu olduğundan, onlar bütün canlı sistemlərin tərkib hissəsidir və onlar hüceyrə daxilində bütün üzvi molekullar arasında baş verən çoxsaylı müxtəlif reaksiyalar zamanı ayrılır. Bu ionlar həmçinin yüksək dərəcədə turş olan mədə şirəsi mədənin daxili divarlarının hüceyrələri tərəfindən ifraz olunanda hüceyrənin daxilinə və xaricinə daşına bilir

Su molekulu dissosasiya edərkən onun iki H—O rabitələrindən biri qırılır. Nəticədə əmələ gələn çox hallarda *proton* adlanan hidrogen ionu sərbəst ion kimi çox qısa həyat dövrünə malik olur və tezliklə su molekuiu ilə kombinasiyaya girərək (birləşərək) hidronium ionunu [H_3O^+] yaradır. H_2O-nun dissosasiyası hər bir H^+ ionu ilə yanaşı bir OH^- ionunu yaradır. Suyun dissosasiyası geriyə dönən reaksiyadır:

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

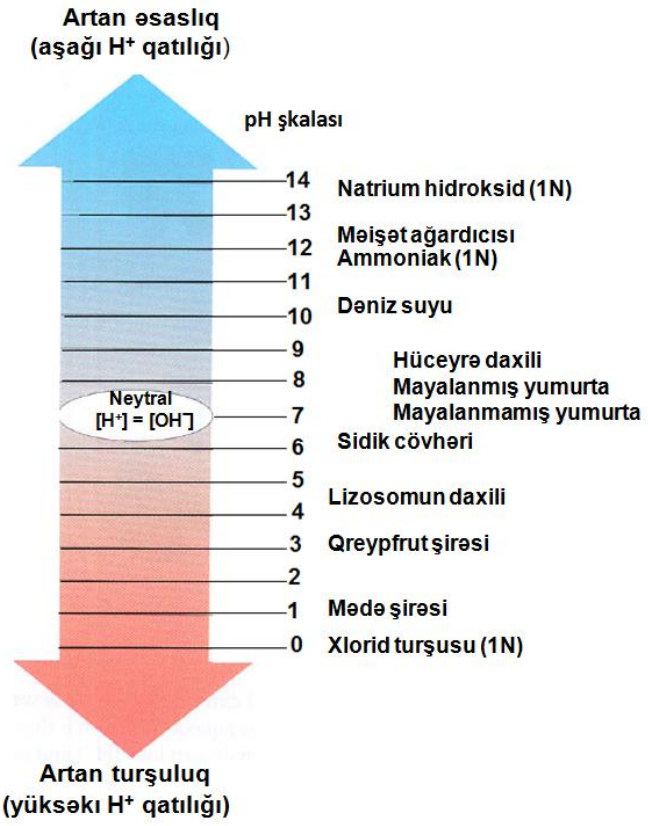
25 ºC-də $[H^+][OH^-] = 10^{-14}$ M^2, belə ki, təmiz suda $[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}$ M.

Məhlulda hidrogen ionlarının qatılığı ənənəvi qaydada pH kimi ifadə olunur və hidrogen ionlarının qatılığının mənfi loqarifmini müəyyən edir. Təmiz suyun pH-ı, 25ºC-də 7-dir:

$$pH = -\log[H^+] = log\frac{1}{[H^+]} = log\frac{1}{10^{-7}} = 7$$

Yadda saxlamaq lazımdır ki, pH-da 1 vahid fərq protonların qatılığında 10 qat fərqi təmsil edir. pH şkalasında 7.0 neytral hesab olunur: 7-dən aşağıya olan pH qiymətləri turş məhlulu göstərir (yüksək $[H^+]$) və 7-dən yuxarı qiymətlər əsas və ya qələvi məhlulu göstərir (Şəkil 2-25). Məsələn, xlorid turşusu (HCl) ilə zəngin olan mədə şirəsunun pH-ı təxminən 1-dir. Onun $[H^+]$, pH-ı təxminən 7.2-7.4 olan sitoplazmadakından million dəfə çoxdur .

Baxmayaraq ki, hüceyrələrin sitozolu normal halda pH 7.2 ətrafındadır, eukariot hüceyrələrində bəzi orqanoidlərin daxili (bax Fəsil 1) bundan çox aşağı pH-a malik ola bilir. Məsələn, lizosomların daxili pH-ı təxminən 4.5-ə yaxınıdır. Lizosomlar daxilində çoxlu miqdarda dağıdıcı fermentlər turş mühitdə optimal işləyirlər, amma onların fəallığı sitoplazmanın neytral mühitə yaxın şəraitində inhibirləşir. Bu nümunədən göründüyü kimi, xüsusi pH saxlanılması bəzi hüceyrə quruluşlarının düzgün funksiyası üçün əhəmiyyətlidir. Digər tərəfdən hüceyrə pH-ında dramatik dəyişiklik hüceyrə fəaliyyətinin tənzimlənməsi üçün əhəmiyyətli rol oynayır. Məsələn, su heyvanı dəniz ulduzunun mayalanmamış yumurtasında sitoplazmanın pH-ı 6.6-dır. Amma mayalanmadan dərhal sonra 1 dəqiqə müddətində onun pH-ı 7.2-ə qalxır, bu $[H^+]$ ilkin qatılığının dörddə birinə qədər azalmasıdır. Bu dəyişiklik yumurtanın sonrakı inkişafı və böyüməsi üçün əhəmiyyətlidir.



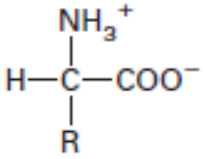
ŞƏKİL 2-25 Ümumi məhlulların pH qiymətləri. Su məhlulunun pH-ı hidrogen ionlarının qatılığının mənfi (əks) loqarifmidir. Hüceyrəxarici və hüceyrədaxili bioloji məhlulların əksəriyyətinin pH qiymətləri 7-ə yaxındır və hüceyrənin, orqanoidlərinin və hüceyrə ifrazatının düzgün fəaliyyətinin imkanı üçün diqqətlə tənzimlənir.

Hidrogen İonları Turşularla Buraxılır və Qələvilərlə Tutulur

Ümumiyyətlə, turşu mənfi yüklənmiş karboksilat ionunu (-COO-C) əmələ gətirmək üçün dissosasiya etməyə meyilli olan karboksil qrupu (-COOH) kimi və ya hidroxlorid turşusu (HCl) kimi hidrogen ionunu (H^+) ayırmağa meyilli olan istənilən molekul, ion və ya kimyəvi qrupdur. Əksinə əsas hidroksil ionu (OH^-), ammonium ionlarını (NH_4^+) əmələ gətirən amonyak (NH_3) kimi və ya amin qrupu kimi asanlıqla H^+ ilə birləşə bilən istənilən molekullar, ion və ya kimyəvi qrupdur.

Turşu su məhluluna əlavə ediləndə $[H^+]$ artır və pH aşağı enir. Əksinə məhlula əsas əlavə olunanda $[H^+]$ azalır və pH qalxır. $[H^+][OH^-] = 10^{-14}$ M^2 olduğundan, $[H^+]$-da olan istənilən artma $[OH^-]$-ın müvafiq azalması ilə tarazlaşır və ya əksinə.

Çox bioloji molekullar həm turşu, həm də əsas qrupuna malikdirlər. Məsələn, neytral məhlulda (pH=7.0) amin turşularının çoxu əsasən ikiqat ionlaşmış formada olurlar, burada karboksil qrupu protonu itirir və amin qurupu onu qəbul edir:



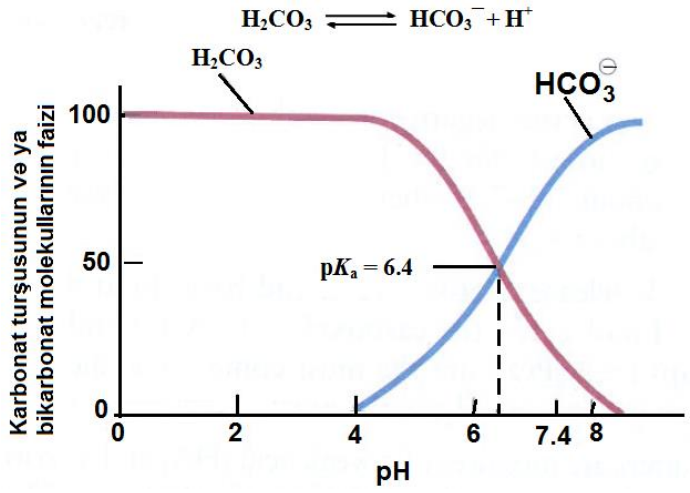
burada R yüksüz yan zənciri göstərir. Bərabər sayda mənfi və müsbət ionlara malik olan bu cür molekul ***zviterion*** adlanır. Zviterionlar xalis yükə malik olmamaqla neytraldırlar. Kəskin pH qiymətində amin turşularının bu iki ionlaşma qabliyyətli qruplarından ancaq biri: aşağı pH-da NH_2^+ , yuxarı pH-da isə $-COO^-$ yüklənir.

İstənilən turşu üçün (və ya böyük molekullarda turşu qrupu üçün) HA dissosasiya reaksiyası $HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$ olacaq. Bu reaksiya üçün K_a kimi göstərilən (indeks ***a*** "turşunu" bildirir) tarazlıq konstantı: $K_a = [H^+][A^-]/[HA]$ kimi müəyyən edilir. Hər iki tərəfdən loqarifm aldıqda və nəticələri yenidən düzdükdə tarazlıq konstantı və pH arasında çox faydalı əlaqə alınır:

$$pH = pK_a + log\frac{[A^-]}{[HA]} \qquad (2\text{-}5).$$

burada pK_a, -log K_a-ya bərabərdir.

Ümumilikdə *Henderson-Hasselbalç bərabərliyi* kimi məlum olan bu ifadədən görmək olar ki, istənilən turşunun pK_a qiyməti onun pH-na bərabərdir, bu zaman molekulların yarısı dissosasiya etmiş, yarısı isə neytral (dissosasiya etməmiş) olur. Bu ona görə belədir ki, $[A^-] = [HA]$ olanda, log $([A^-]/[HA]) = 0$ olur, beləliklə pK_a = pH. Henderson-Hasselbalç bərabərliyi məhlulun pH-nın və turşunun pK_a qiymətinin məlum olduğu halda bizə turşunun dissosasiya dərəcəsini, dissosasiya etmiş və etməmiş formaların nisbətini hesablamağa imkan verir. Eksperimental yolla məhlulun pH-nın funksiyası kimi $[A^-]$ və $[HA]$ ölçmək yolu ilə turşunun pK_a-nı hesablamaq olar və beləliklə dissosasiya reaksiyası üçün tarazlıq konstantı K_a-nı hesablamaq olar (Şəkil 2-26). Molekulun pK_a-sının məlum olması yalnız onun xassəsinin əhəmiyyətli təsvirini vermir, o həmçinin bizə bu xassələrdən istifadə edərək, su məhlulunun turşuluğunu manipulyasiya etməyə (dəyişməyə) imkan verir və bioloji sistemlərin özlərinin su mühitindəki bu kritik xüsusiyyətlərə necə nəzarət etdiyini anlamağa imkan verir.

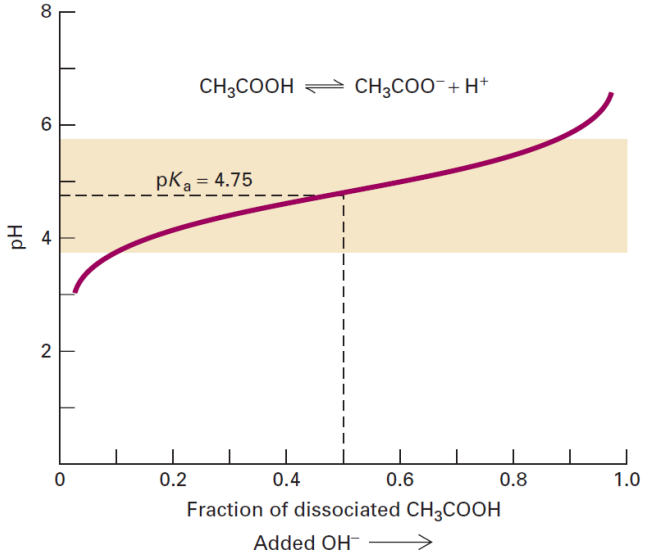


ŞƏKİL 2-26 pH, pK_a və turşuların dissosasiyası arasında münasibət. Karbonat turşusu məhlulunun pH-ı 0-dan 8.5 qalxanda dissosasiya olunmamış və ya ionlaşmamış formalarda (H_2CO_3) qarışığın faiz tərkibi 100 faizdən azalır, ionlaşmış formalar isə 0 faizdən artır. pH (6.4) turşunun pK_a-na bərabər olanda karbon turşususnun yarısı ionlaşmış olur. pH 8-dən yuxarı qalxanda virtual olaraq bütün karbonat turşusu bikarbonat (HCO_3^-) formasına dissosasiya etmiş olur.

Buferlər Hüceyrədaxili və Hüceyrəxarici Mayelərdə pH-ı Saxlayır

Fəal maddələr mübadiləsi gedən canlı hüceyrələr sitoplazmada sabit pH-ı 7.2–7.4 saxlamalıdırlar və onlar bunu hətta öz metabolizmi kimi çox turşu istehsal etsələr də etməlidirlər. Hüceyrələr zəif turşuların və zəif əsasların **buferlər** adlandırılan rezervuarına malikdirlər, bu buferlər hüceyrədə sitoplazmatik pH-ın maddələr mübadiləsi yolu ilə əmələ gələn və ya molekulların və ionların ifrazı yolu ilə hüceyrə tərəfindən alınan H^+ və ya OH^- miqdarındakı kiçik tərəddüdlərə baxmayaraq kifayət qədər sabit qalmasını təmin edirlər. Buferlər bunu H^+ və ya OH^- ionları hüceyrəyə əlavə olunanda və ya maddələr mübadiləsi yolu ilə istehsal olunduqda onların artıq miqdarını "hopmaqla" edirlər. Bizim aşağıda görəcəyimiz kimi, məhlulun pH-ı buferin pK_a-na oxşar olanda buferlər pH-ın dəyişilməsinin qarşısını almaq üçün daha effektiv olurlar.

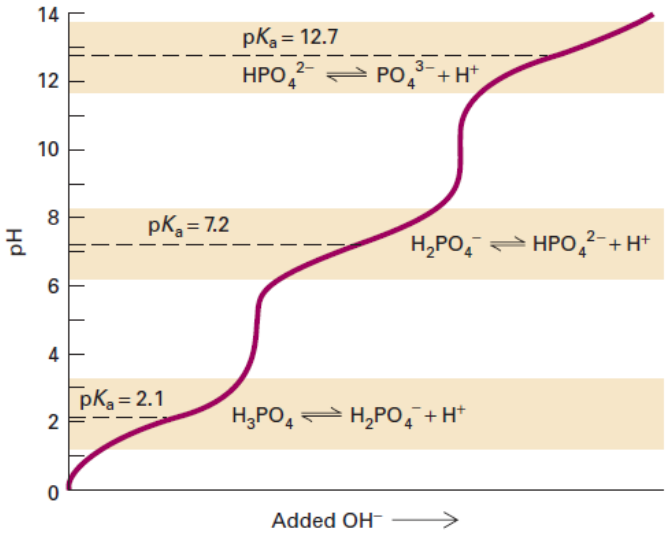
Əgər pH-ı pK_a-sına bərabər olan ($[HA] = [A^-]$) bufer məhluluna əlavə turşu (və ya əsas) əlavə edilərsə məhlulun pH-ı dəyişilir, amma bu dəyişilmə bufer olmayan haldakı dəyişilmədən az baş verir. Bu ona görə belədir ki, əlavə edilmiş turşulardan ayrılan proton buferin ionlaşmış forması (A^-) tərəfindən tutulur, eləcə də əsasın əlavə olunması ilə yaranan hidroksil ionları, dissosasiya olunmamış buferin (HA) buraxdığı protonlarla neytrallaşdırılır. Maddənin hidrogen ionlarını azad etmə qabliyyəti və ya onları götürmə qabliyyəti bu maddənin artıq götürdüyü və ya buraxdığı protonların dərəcəsindən qismən asılıdır və bu da öz növbəsində məhlulun maddənin pK_a-na yaxın olan pH-ından asılıdır. Buferin pH-da dəyişikliyi azaltmaq qabliyyəti, onun *bufer tutumu* buferin qatılığından və onun p*Ka* qiyməti ilə pH-ı arasındakı qarşılıqlı əlaqəsindən asılıdır və Henderson-Haselbalç tənliyi ilə ifadə olunur.



ŞƏKİL 2-27 Asetat turşusu (CH_3COOH) buferi əyrisinin titirlənməsi. Asetat turşusunun hidrogenə və asetat ionlarına dissosasiyasının pK_a qiyməti 4.75-dir. Bu pH-da turşu molekullarının yarısı dissosasiya olunur. pH loqarifmik miqyasda ölçüldüyündən məhlul pH 3.75-də 91 faiz CH_3COOH-dan pH 5.75-də 9 faiz CH_3COOH-a dəyişilir. Bu pH diapozonunda turşu maksimum bufer tutumuna malik olur.

Asetat turşusu üçün Şəkil 2-27-də verilmiş titirləmə əyrisi ionlaşmamış (HA) və ionlaşmış formalarda (A^-) molekulun fraksiyalarına pH-ın təsirini göstərir. pH pK_a-ya bərabər olanda asetat turşusunun yarısı dissosasiya edir (qırıq xətlər). Turşunun pK_a qiymətindən aşağı bir pH vahidində molekulun 91 faizi HA formasında olur, pK_a qiymətindən yuxarı bir pH vahidində isə 91 faiz A^- formasında olur. pH-n pK_a-dan bir vahiddən artıq yuxarı və ya aşağı olan qiymətində (Şəkil 2-27-də qırıq xətlər olmayan rayonlar) zəif turşuların və zəif əsasların bufer tutumu sürətlə azalmağa başlayır. Başqa sözlə, eyni sayda əsas mollarının, məsələn natrium hidroksid (NaOH) kimi hidroksil ionlarının HA və A^- qatışığından ibarət olan və pH-ı pK_a-na yaxın olan məhlula əlavə edilməsi HA və A^- mövcud olmayan və ya pH-ı pK_a qiymətindən uzaq olan məluldakına nisbətən daha az pH dəyişikliyinə səbəb olacaq.

Bütün bioloji sistemlər bir və ya daha artıq buferə malik olurlar. Fosfat ionları, fosfat turşusunun ionlaşmış formaları hüceyrədə kifayət qədər yüksək miqdarda təmsil olunur və sitoplazmada pH-ın saxlanılması və buferləşməsi üçün əhəmiyyətli faktordur. Fosfat turşusunun (H_3PO_4) dissosasiya etmək qabliyyətinə malik olan üç protonu vardır, amma onların hamısı eyni zamanda dissosasiya etmirlər. Hər bir protonun itirilməsi Şəkil 2-28-də göstərildiyi kimi, diskret dissosasiya reaksiyası və pK_a qiyməti ilə təsvir oluna bilir. Hidroksil ionlarını fosfat turşusu məhluluna əlavə etdikdə üç pK_a qiymətinə yaxın olan pH qiymətlərində (kölgələnmiş rayon) pH dəyişilməsi məhlulun pH-nın pK_a-ların heç birinə oxşar olmadığı hala nisbətən daha az dik olur. Fosfat turşusu üçün titirləmə əyrisi göstərir ki, ikinci protonun dissosasiyası üçün pK_a 7.2-dir.



ŞƏKİL 2-28 Bioloji sistemlərdə ümumi bufer olan fosfat turşusunun (H_3PO_4) titirləmə əyrisi. Bu hər yerdə yayılan bioloji molekul üç müxtəlif pH qiymətdə dissosasiya edən üç hidrogen atomuna malikdir; beləliklə, fosfat turşusu qrafikdə qeyd olunduğu kimi, üç pK_a qiymətinə malikdir. Kölgələnmiş zona, üç pK_a qiymətlərinin bir pH vahidi daxilində pH diapozonlarını göstərir — burada fosfat turşusunun bufer tutumu yüksəkdir. Bu rayonlarda turşunun (və ya əsasın) əlavə edilməsi pH-da nisbətən kiçik dəyişikliyin yaranmasına səbəb olacaq.

Beləliklə, Henderson-Hasselbalç bərabərliyinə əsasən pH 7.2-də hüceyrənin fosfat turşusunun 50 faizi $H_2PO_4^-$ kimi və 50 faizi isə HPO_4^{2-} fomasındadır. Bu səbəbdən fosfat pH 7.2 ətrafındakı qiymətlərdə çox gözəl buferdir, bu sitoplazmanın pH-na və insan qanının pH 7.4 qiymətinə yaxındır. Zülalların amin turşularının yan zəncirlərinin amin (lizin), quanidin (arqinin) və karboksilat (aspartat, qlutamat) hissələri, eləcə də zülalın N– və C–sonluqlarında amin və karboksil qrupları protonu özlərinə birləşdirə və buraxa bilirlər. Beləliklə, hüceyrə daxilində və hüceyrəxarici mayedə yüksək qatılıqda olan zülallar özləri bufer rolunu oynaya bilirlər.

2.3 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSIYALARI

Kimyəvi Reaksiyalar və Kimyəvi Tarazlıq

- Düzünə reaksiyanın sürəti ilə geriyə reaksiyanın sürəti bərabər olanda kimyəvi reaksiyalar tarazlıqda olur, və beləliklə, reagentlərin və reaksiya məhsulunun qatılığında xalis dəyişiklik olmur.
- Reaksiyanın tarazlıq konstantı K_{eq}, tarazlıqda reaksiya məhsullarının reagentlərə olan nisbətini əks etdirir və beləliklə, reaksiyanın ölçü dərəcəsi və reagentlərlə reaksiya məhsulunun nisbi stabillik dərəcəsidir.
- K_{eq}, reagentlərin və reaksiya məhsullarını temperaturundan, təzyiqindən və həmçinin kimyəvi xassələrindən asılıdır, amma reaksiya sürətindən və reagentlərin və reaksiya məhsullarının ilkin qatılığından asılı deyildir.
- İstənilən reaksiya üçün tarazlıq konstantı K_{eq}, düzünə reaksiyanın sürət konstantının nisbətini geriyə reaksiyanın sürət konstantına bərabərləşdirir (k_f/k_r). Reagentlərin məhsula və əksinə çevrilməsi sürəti sürət konstantlarından və reagentlərin və ya reaksiya məhsulunun qatılığından asılıdır.
- Hüceyrə daxilində metabolik yollardakı əlaqəli reaksiyalar əsasən stabil vəziyyətdədirlər, tarazlıqda deyillər, bu zaman aralıq məhsulların əmələ gəlməsi sürəti onların sərf olunması sürətinə bərabərdir (bax Şəkil 2-23), beləliklə aralıq məhsulun qatılığı dəyişilmir.
- İki molekulun qeyri-kovalent rabitə ilə birləşməsinin dissosasiya konstantı-K_d molekullar arasında formalaşmış kompleksin (məsələn, liqand-reseptor və ya DNT-zülal kompleksləri) stabillik ölçüsüdür. ~10^{-9} M (nanomolyar) K_d qiyməti möhkəm, ~10^{-6} M (mikromolyar) orta möhkəm və ~10^{-3} M (millimolyar) nisbətən zəif hesab edilir.
- pH hidrogen ionlarının qatılığının mənfi loqarifmidir (–log [H^+]). Normal halda sitoplazmanın pH-ı 7.2-7.4-ə yaxındır, halbuki lizosomların daxilində pH 4.5 yaxındır.
- Turşular protonları (H^+) buraxır, əsaslar isə onları birləşdirir.
- Buferlər zəif turşuların (HA) və onların uyğun olan əsas formalarının (A^-) qarışığıdır, turşu və ya əsas əlavə edilən zaman məhlulda pH-ın dəyişilməsini minimuma qədər azaldırlar. Bioloji sistemlər pH-ı çox dar bir diapozonda saxlamaq üçün müxtəlif buferlərdən istifadə edirlər.

2.4 Biokimyəvi Energetika

Enerjinin transformasiyası, onun saxlanması və onun istifadəsi hüceyrə iqtisadiyyatının mərkəzidir. Enerji iş görmək qabiliyyəti kimi təyin edilə bilər, hüceyrələrdə tətbiq olunan bu

konsepsiya avtomobil mühərrikində və elektrik stansiyasında tətbiq olunan kimidir. Kimyəvi rabitələrdə saxlanılan enerji hüceyrələrdə kimyəvi işi və hüceyrələrin fiziki hərəkətini həyata keçirmək üçün istifadə oluna bilər. Bu bölmədə biz enerjinin kimyəvi reaksiyanın gedişinə necə təsir edəcəyinə (kimyəvi termodinamikaya) və kimyəvi reaksiyaların sürətinə (kimyəvi kinetikaya) baxacağıq.

Enerjinin Bir neçə Forması Bioloji Sistemlər Üçün Əhəmiyyətlidir

Enerjinin iki əsas prinsipal forması var: kinetik və potensial enerji. **Kinetik enerji** hərəkətin enerjisidir — məsələn, molekulların hərəkəti. **Potensial enerji** saxlanılan ehtiyat enerjidir — məsələn, kovalent kimyəvi rabitələrdə saxlanılan enerji. Potensial enerji hüceyrənin enerji qənaitində xüsusən əhəmiyyətli rol oynayır

Termal enerji və ya istilik kinetik enerjinin formasıdır — molekulların hərəkət enerjisidir. İstiliyin iş görməsi üçün o molekulların orta hərəkət sürətinin yüksək olduğu yüksək temperatur rayonundan aşağı temperatur rayonuna axmalıdır. Baxmayaraq ki, temperatur fərqi hüceyrənin daxili və xarici mühitləri arasında mövcuddur, bu termal qradientlər adətən hüceyrə fəaliyyətinin enerji mənbəyi kimi istifadə olunmur. Termotənzimləmə mexanizminin inkişaf etdiyi istiqanlı heyvanlarda termal enerji əsasən sabit orqanizm temperaturunu saxlamaq üçün istifadə olunur. Bu əhəmiyyətli homeostatik funksiyadır, çünki çoxsaylı hüceyrə fəallığının sürəti temperaturdan asılıdır. Məsələn, məməlilərin hüceyrələrinin 37ºC normal bədən temperaturundan 4ºC enməsi virtual olaraq çoxsaylı hüceyrə proseslərini (məsələn, hüceyrədaxili membran hərəkətlərini) dondura və ya dayandıra bilər.

Radiant enerji fotonların və ya işıq dalğalarının kinetik enerjisidir və biologiyada kritik əhəmiyyətə malikdir. Radiant enerji termal enerjiyə çevrilə bilir, məsələn, işıq molekullarla udulan zaman enerji molekulların hərəkətinə çevrirlir. Molekullarla udulan radiant enerji molekulların elektron quruluşunu dəyişdirə bilir, elektronlar yüksək enerjili orbitlərə keçir, sonra o iş görmək üçün buradan bərpa olunur. Məsələn, fotosintez zamanı xlorofil kimi piqment molekulları tərəfindən udulan işıq enerjisi sonradan kimyəvi əlaqələrin enerjisinə çevrilir. (bax Fəsil 12).

Mexaniki enerji biologiyada kinetik enerjinin əsas forması olub əsasən ehtiyat saxlanılmış kimyəvi enerjidən alınır. Məsələn, sitoskelet filamentin uzunluğundakı dəyişiklik membranları və orqanoidləri itələyən və ya dartan gücü yaradır (bax Fəsil 17 və 18).

Elektrik enerjisi – elektronların və ya başqa yüklənmiş zərrəciklərin hərəkət enerjisi kinetik enerjinin başqa tip əsas formalarındandır, elektrik fəal neyronlar kimi membran funksiyasında xüsusi əhəmiyyətə malikdir (bax Fəsil 22).

Potensial enerjinin bir neçə forması bioloji əhəmiyyətə malikdir. Biologiyanın mərkəzi hissəsi kimyəvi potensial enerji atomları molekullarda birləşdirən rabitələrdə saxlanılan enerjidir. Həqiqətən də bu kitabda təsvir olunan biokimyəvi reaksiyaların əksəriyyətinə ən azı bir kimyəvi əlaqənin qırılması və ya yaradılması daxildir. Kimyəvi maddələr enerji ayıran reaksiyaya girəndə biz bu enerjini hiss edirik. Məsələn, qlükozanın kovalent rabitələrində olan yüksək potensial enerji hüceyrədə tənzimlənən fermentativ yanma (oksidləşmə) yolla azad ola bilir (bax Fəsil 12). Enerji hüceyrə tərəfindən çoxsaylı müxtəlif işləri həyata keçirmək üçün istifadə olunur.

Potensial enerjinin ikinci bioloji əhəmiyyətə malik olan forması **qatılıq qradient**ində olan enerjidir. Maddənin qatılığı maneənin bir tərəfində yüksək olanda, məsələn membranın bir tərəfində digər tərəfindəkindən fərqli olanda qatılıq qradienti mövcud olur. Bütün hüceyrələr qida maddələrinin, tullantı məhsullarının və ionların onları əhatə edən mühitlə selektiv mübadiləsini həyata keçirərkən hüceyrədaxili və xarici mayelər arasında qatılıq qradienti yaradırlar. Hüceyrə daxilində orqanoidlər də (motoxondrilər, lizosomlar) tez-tez hallarda ionların və başqa maddələrin fərqli qatılıqlarına malik olurlar; son bölmədə bizim gördüyümüz kimi lizosom daxilində zülalların qatılığı sitoplazmadakından 500 dəfə çox olur. Protonların membrandan keçən qatılıq qradienti mitoxondridə enerji istehsalının çox əhəmiyyətli idarəedicisidir.

Hüceyrələrdə potensial enerjinin üçüncü forması, **elektrik potensialı** – yüklərin ayrılması enerjisidir. Məsələn, virtual olaraq bütün hüceyrələrin hər sm plazma membranından keçən ~200000 volt elektrik yükü qradienti mövcuddur. Qatılıq qradientinin və hüceyrə membranının əks tərəflərində potensial fərqin necə yarandığını və saxlandığını biz Fəsil 11-də və onların necə kimyəvi potensial enerjiyə çevrildiyini Fəsil 12-də müzakirə edirik.

Hüceyrələr Bir Tip Enerjini Digərinə Çevirə Bilirlər

Termodinamikanın birinci qanununa görə enerji nə yaranır nə də itir, o yalnız bir formadan digərinə çevrilir. (Nüvə reaksiyasında kütlə enerjiyə çevrilir, ancaq bu bioloji sistemlərdə uyğun gəlmir.) Enerjinin çevrilməsi biologiyada çox əhəmiyyətlidir. Məsələn, fotosintezdə işığın radiant enerjisi saxaroza və ya nişasta molekulunda atomlar arasındakı kovalent rabitələrin kimyəvi potensial enerjisinə transformasiya olunur. Əzələlərdə və sinirlərdə kovalent rabitələrdə saxlanılan kimyəvi potensial enerji uyğun olaraq əzələ yığılmasının kinetik enerjisinə və sinir ötürmələrinin elektrik enerjisinə transformasiya olunur. Bütün hüceyrələrdə müəyyən kimyəvi rabitələrin qırılması ilə ayrılan potensial enerji qatılıq və elektrik potensialı qradienti formalarında potensial enerjinin yaranmasında istifadə olunur. Eynilə kimyəvi qatılıq qradientində və ya elektrik potensialı qradientində saxlanılan enerji kimyəvi rabitələrin sintezində və ya qatılıq qradientini yaratmaq üçün molekulların membranın bir tərəfindən digər tərəfinə daşınmasında istifadə olunur. Sonuncu proses qlükoza kimi qida maddələrinin müəyyən hüceyrələr daxilinə və çoxsaylı tullantı məhsullarının hüceyrə xaricinə daşınması zamanı baş verir.

Bütün enerji formaları bir-birinə çevrilə bildiyindən onlar hamısı eyni ölçü vahidləri ilə ifadə oluna bilər. Hərçənd ki, enerjinin standart vahidi "**joul**"dur, biokimyaçılar ənənəvi olaraq alternativ vahiddən, **kalorid**ən (1 joul = 0.239 kalori) istifadə edirlər. Kalori 1 qram suyun temperaturunu 1ºC qaldırmaq üçün tələb olunan enerjinin miqdarıdır. Bu kitab boyu biz enerji dəyişikliklərini ölçmək üçün kilokaloridən (1kkal = 1000 kal) istifadə edirik. Siz qidada "Kalorilər" barədə oxuyanda və ya eşidəndə (böyük C hərfi ilə işarə edilir), demək olarki söz həmişə burada təyin edildiyi kimi kilokalorilərlə gedir.

Sərbəst Enerjidəki Dəyişiklik Kimyəvi Reaksiyaların Spontan Baş Verəcəyini Təyin Edir

Kimyəvi reaksiyalar proses zamanı enerjinin ayrılmasından və ya udulmasından asılı olaraq iki tipə bölünür. **Eqzogen** (enerji azad edən) reaksiyalarda reaksiya məhsulu reagentlərdən az enerjiyə malik olur. Eqzogen reaksiyalar spontan (kortəbii) baş verir. Azad olmuş enerji adətən istilik şəkilində buraxılır (molekulyar hərəkətin enerjisi) və əsasən temperaturun qalxması ilə nəticələnir, məsələn ağacın oksidləşməsi (yanması) kimi. **Endogen** ("enerji-udan") reaksiyalarda reaksiya məhsulu reagentlərdən daha çox enerji saxlayır və enerji reaksiyanın gedişi zamanı udulur. Əgər endogen reaksiyanı aparmaq üçün xarici enerji mənbəyi olmazsa, o zaman reaksiya baş vermir. Endogen reaksiyalar ani soyuq paketlərin yaranmasına səbəb olur, ona görə də otaq temperaturundan kəskin aşağı salmaqla yaraların müalicəsi zamanı istifadə olunur. Reagentlər paketinin dağıdılması reagentlərin qatışmasına və reaksiyanın başlanmasına səbəb olur.

Reaksiyanın eqzogen və ya endogen olmasını və ona görədə onun spontan və ya qeyri-spontan yolla baş verirməsini anlamaq üçün fundamental əhəmiyyətə malik olan konsepsiya **sərbəst enerjid**ir, J.W. Gibbisin xatirəsinə G ilə adlandırılır. 1863-cü ildə Amerikada mühəndislik üzrə ilk fəlsəfə doktoru (PhD) dərəcəsini alan Gibbs göstərdi ki, "bütün sistemlər elə yolla dəyişilir ki, sərbəst enerji [G] minimum olur". Başqa sözlə, reaksiya məhsullarının sərbəst enerjisi reagentlərin sərbəst enerjisindən aşağı olanda kimyəvi reaksiyalar spontan yolla baş verir. Kimyəvi reaksiyaların **reagent $\rightleftharpoons$ reaksiya məhsuslu** formasında baş verməsi zamanı sərbəst enerji dəyişilməsi ΔG aşağıdakı formula ilə göstərilir:

$$\Delta G = G_{\text{məhsullar}} - G_{\text{reagentlər}}$$

ΔG-nin istənilən kimyəvi reaksiyanın istiqamətinə olan münasibəti üç açıqlamada ümumiləşdirilə bilər:

- Əgər ΔG mənfidirsə, düzünə reaksiya spontan baş verməyə meyilli olacaq və reaksiya baş verərkən adətən enerji ayrılacaq (eqzogen reaksiya) (Şəkil 2-29). Mənfi ΔG-ə malik olan reaksiya termodinamik cəhətdən əlverişli hesab edilir.
- Əgər ΔG müsbətdirsə, düzünə reaksiya spontan baş verməyəcək, reagentlərin reaksiya məhsuluna çevrilməsi üçün sistemə enerji əlavə etmək lazım gələcək (endogen reaksiya).
- Əgər ΔG sıfırdırsa, həm düzünə, həm də geriyə reaksiya bərabər sürətlə gedəcək və reagentlərin son reaksiya məhsuluna və ya geriyə tam spontan çevrilməsi baş verməyəcək; sistem tarazlıqda olacaq.

Konvensiyaya görə reaksiyanın *standart sərbəst enerji dəyişməsi* ($\Delta G^{o\prime}$), 298 K (25°C), 1 atmosfer təzyiqdə, pH 7.0-də (təmiz sudakı kimi) və bütün reagentlərn, eləcə də 10^{-7} M saxlanılan protonlar istisna olmaqla (pH 7.0-də) bütün reaksiya məhsullarının başlanğıc 1 M qatılığında olan şəraitdə sərbəst dəyişmə qiymətidir. Bioloji reaksiyaların çoxu, xüsusən də normal halda 1 M-dan aşağı olur reagentlərin yuxarı qatılığında standart şəraitdən fərqlənir.

Kimyəvi sistemin sərbəst enerjisi $G = H - TS$ kimi təyin edilə bilər, burada H rabitə enerjisidir və ya sistemin **entalpiya**sıdır, T Kelvin şkalası (K) ilə onun temperaturudur, S isə **entropiya,** onun **təsadüfilik** və ya nizamsızlıq ölçüsüdür.

Termodinamikanın ikinci qanununa görə istənilən sistemin təbii meyilliliyi onun daha çox nizamsız olmasıdır – daha doğrusu entropiyanın artmasıdır. Reaksiya yalnız entalpiya və entropiyanın dəyişilməsinin kombinasiya olunmuş təsiri aşağı ΔG-ə səbəb olanda spontan ola bilər, yəni əgər temperatur konstant olarsa, reaksiya o zaman spontan davam edəcək ki, yalnız sərbəst enerşinin dəyişməsi ΔG aşağıdakı tənliyə görə mənfi olsun:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad (2\text{-}26)$$

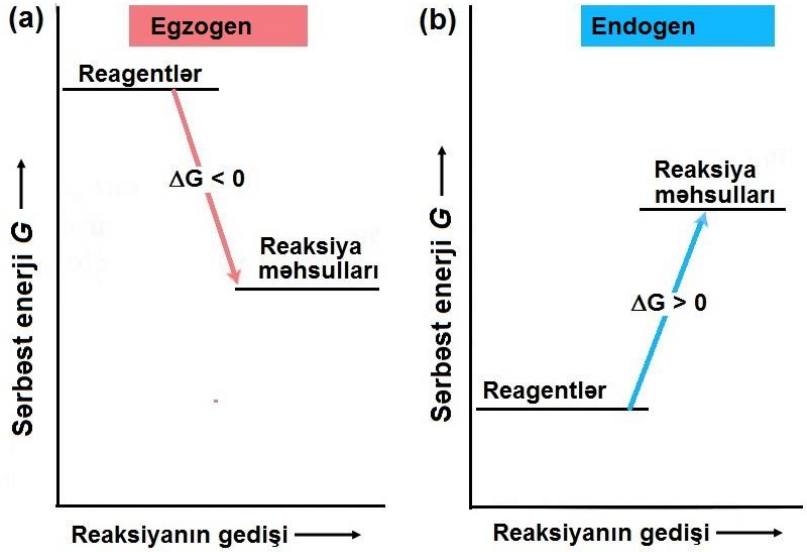
Eqzotermik ("istilik buraxan") kimyəvi reaksiyada ΔH mənfidir. **Endotermik** ("istiliyi udan") reaksiyalarda ΔH müsbətdir. Entalpiya və entropiyadakı dəyişikliyin birgə təsiri reaksiya üçün ΔG-nin müsbət və ya mənfi olduğunu təyin edir və beləliklə reaksiyanın spontan baş verəcəyini müəyyən edir. Entropiyanın artdığı ($\Delta S > 0$) eqzotermik reaksiya ($\Delta H < 0$) spontan baş verir ($\Delta G < 0$). Əgər ΔS kifayət qədər artarsa və bu zaman TΔS şərtləri müsbət ΔH-a üstün gələrsə, endotermik reaksiya ($\Delta H > 0$) spontan baş verəcəkdir.

Çoxsaylı bioloji reaksiyalar ardıcıllığın artmasına səbəb olur və beləliklə entropiyanı ($\Delta' < S$) azaldır. Buna amin turşularının birləşərək zülalları yaratması reaksiyası bir aydın nümunədir. Zülalların məhlulu onları təşkil edən eyni amin turşularının zülallarda birləşməmiş haldakı məhlulundan daha aşağı entropiyaya malikdir, çünki amin turşularının sərbəst hərəkəti uzun zəncirdə zülalların tərkibində birləşdiyi halda (yüksək ardıcıllıqda) birləşmədiyi hala nisbətən çox məhduddur. Beləliklə, hüceyrələr zülallar kimi polimerləri onları təşkil edən monomerlərindən sintez edən zaman hüceyrələr enerjini səmərəli şəkildə həm monomerləri bir yerdə saxlayan əlaqələrin yaranmasına, həm də polimerləşməni müşayət edən entropiyada itirilməni aradan qaldırmağa ötürürsə, o zaman polimerləşmə reaksiyası spontan olacaq. Çox zaman hüceyrələr bu bacarığı belə sintetik, entropiya-azaldan reaksiyaları çox yüksək mənfi ΔG-si olan sərbəst reaksiyalarla "birləşdirməklə" həyata keçirirlər (bax aşağıda). Bu yolla hüceyrələr öz mühütlərindəki enerji mənbəyini yüksək təşkil olunmuş quruluşun yaranmasına və həyat üçün əhəmiyyətli olan maddələr mübadiləsi yollarına çevirə bilirlər.

Reaksiya zamanı ΔG sərbəst enerjidə faktiki dəyişilməyə temperatur, təzyiq və reagentlərin və reaksiya məhsullarının ilkin qatılığı da təsir edir, beləliklə o adətən standart sərbəst enerji dəyişməsi $\Delta G^{o\prime}$-dən fərqlənir. Su mühitində baş verən digər reaksiyalar kimi, bioloji reaksiyaların əksəriyyəti də həmçinin məhlulun pH təsirinə məruz qalır. Biz temperatur üçün və standart şəraitdən fərqlənən ilkin qatılıq üçün sərbəst enerji dəyişməsini aşağıdakı tənlikdən istifadə etməklə hesablaya bilərik:

$$\Delta G = \Delta G^{o\prime} + RT \ln Q = \Delta G^{o\prime} + RT \ln \frac{[\text{reaksiya məhsulu}]}{[\text{reagent}]} \qquad (2\text{-}7)$$

burada R, 1.987 kal/(dərəcə·mol) bərabər olan qaz konstantıdır, T temperaturdur (dərəcə Kelvinlə) və Q reaksiya məhsullarının reagentlərə olan *ilkin* nisbətidir. İki molekulun birləşərək üçüncünü əmələ gətirdiyi A + B $\rightleftharpoons$ C reaksiyası üçün 2-7 tənliyindəki Q-ə bərabər olacaq [C]/[A][B]. Bu halda, [A] və ya [B]-nin ilkin qatılığında yüksəlmə ΔG-nin çox yüksək mənfi qiymətinə səbəb olacaq və beləliklə reaksiyanı C-nin spontan əmələ gəlməsinə yönəldəcək.



ŞƏKİL 2-29 Eqzogen və endogen raksiyalar zamanı sərbəst enerjidə (ΔG) dəyişiklik. (a) Eqzogen reaksiyalarda reaksiya məhsulunun sərbəst enerjisi reagentlərinkindən aşağı olur. Uyğun olaraq bu reaksiyalar spontan yolla baş verir və reaksiya davam etdikcə enerji ayrılır. (b) Endogen reaksiyalarda reaksiya məhsulunun sərbəst enerjisi reagentlərinkindən yuxarı olur və bu reaksiyalar spontan baş vermir. Reagentlərin reaksiya məhsuluna çevrilməsi üçün xarici enerji mənbəyi təmin olunmalıdır.

Xüsusi biokimyəvi reaksiyaların $\Delta G^{o\prime}$-dən asılı olamayaraq reagentlərin və məhsulun verilmiş hüceyrədaxili qatılığında ΔG yalnız mənfi olan halda hüceyrə daxilində reaksiya spontan şəkildə davam edəcək. Məsələn, qliseraldehid-3-fosfatın (G3P) dehidroksiaseton fosfata (DHAP) çevrilməsi qlükozanın parçalanmasında iki aralıq məhsulun,

$$\text{G3P} \rightleftharpoons \text{DHAP}$$

$\Delta G^{o\prime}$ qiyməti –1840 kal/mol-dur. Əgər G3P və DHAP-ın ilkin qatılığı bərabərdirsə, onda $\Delta G = \Delta G^{o\prime}$, çünki RT ln = 0; bu vəziyyətdə geriyə dönə bilən reaksiya G3P⇌DHAP spontan şəkildə DHAP formalaşması istiqamətində tarazlığı çatana qədər davam edəcək. Amma əgər başqa standart şərtlərlə ilkin [DHAP] 0.1 M və ilkin [G3P] 0.001 M-dursa, onda 2-7 tənliyindəki Q, 0.1/0.001 =100 bərabər olacaq və bu da ΔG qiymətini +0.887 cal/mol verəcək. Bu şərtlər daxilində reaksiya G3P-nin əmələ gəlməsi istiqamətində davam edəcək.

Reaksiya üçün ΔG reaksiya sürətindən asılı deyildir. Həqiqətən də normal fizioloji şəraitdə həyat qabiliyyətini saxlamaq üçün tələb olunan çox az və ya heç bir biokimyəvi reaksiya reaksiya sürətini qaldıran bəzi mexanizmlər olmadan baş verəcək. Bizim aşağıda və daha ətraflı şəkildə Fəsil 3-də təsvir etdiyimiz kimi, bioloji sistemlərdə reaksiyanın sürəti adətən ΔG qiymətini dəyişmədən, reagentlərdən reaksiya məhsullarının yaranmasını sürətləndirən, katalizator zülalların, **fermentlərin** fəallığı ilə təyin edilir.

Reaksiyanın $\Delta G^{o\prime}$-i Onun K_{eq}-dən Hesablana Bilər

Tarazlıqda olan kimyəvi qarışıq minimal sərbəst enerjinin sabit vəziyyətindədir. Tarazlıqda olan sistem üçün ($\Delta G = 0$, $Q = K_{eq}$) standart şərait altında biz yaza bilərik

$$\Delta G^{o\prime} = -2.3\text{RT}\log K_{eq} = -1362\log K_{eq} \qquad (2\text{-}8)$$

(qeyd etməli ki, dəyişiklik 10-luq loqarifmə əsaslanır). Beləliklə, əgər biz reagentlərin və məhsulun qatılığını tarazlıqda təyin ediriksə (yəni, K_{eq}), onda biz $\Delta G^{o\prime}$ qiymətini hesablaya bilərik. Məsələn, qliseraldehid 3 fosfatın dihidrooksiaseton fosfata qarşılıqlı çevrilməsi (G3P⇌DHAP) standart şəraitdə 22.2-dir. Bu qiymətləri 2-8 tənliyində yerinə qoysaq biz asanlıqla $\Delta G^{o\prime}$ hesablaya bilərik, bu reaksiya üçün $\Delta G^{o\prime}$=–1840 kal/mol olacaq.

Tənlik 2-8 yenidən düzməklə və antiloqarifm etməklə biz alırıq:

$$K_{eq} = 10^{-(\Delta G^{o\prime}/3.3RT)} \qquad (2\text{-}9)$$

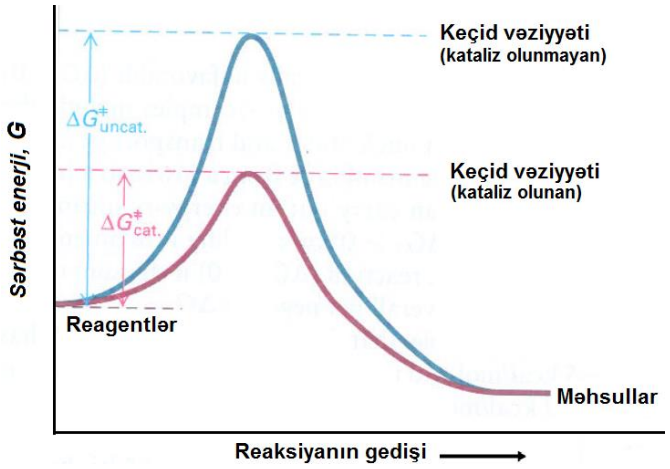
Bu ifadədən aydın şəkildə görünür ki, əgər $\Delta G^{o\prime}$ mənfidirsə, eksponent müsbət olacaq və buradan da K_{eq} 1-dən böyük olacaq. Ona görə də tarazlıqda məhsullar reagentlərdən daha çox olacaq, başqa sözlə, reagentlərdən məhsulun formalaşması səmərəli olacaq. Əksinə, əgər $\Delta G^{o\prime}$ müsbətdirsə, eksponent mənfi olacaq, K_{eq} isə 1-dən az olacaq. K_{eq} və $\Delta G^{o\prime}$ arasındakı qarşılıqlı əlaqələr reagentlərin və məhsulların nisbi sərbəst enerjilərinin reaksiyanın spontan baş vermə dərəcəsinə təsirini daha da vurğulayır.

Reaksiyanın Sürəti Reagentləri Keçici Vəziyyətə Gətirmək Üçün Lazım Olan Fəallaşma Enerjisindən Asılıdır

Kimyəvi reaksiya davam etdikcə reagentlər bir-birinə yaxınlaşır, bəzi əlaqələr yaranmağa, başqaları isə qırılmağa başlayır. Bu keçid dövründə molekulların vəziyyətini anlamağın bir yolu odur ki, atomların elektron konfiqurasiyasında və onların rabitələrində gərginlik olur. Reaksiya gedişində atomlar toplusu reagentlərin nisbətən sabit vəziyyətindən aralıq keçid vəziyyətinə və sonra da yüksək-enerjili vəziyyətinə keçirlər (Şəkil 2-30). Kimyəvi reaksiyanın gedişində sistemin özünün ən yüksək enerji səviyyəsində olduğu vəziyyət **keçici vəziyyəti** adlanır və bu vəziyyətdə reagentlərin toplusu **aralıq keçid vəziyyəti (transition-state intermediate)** adlanır. Belə yüksək enerji vəziyyətində reagentləri həyacanlandırmaq üçün lazım olan enerji reaksiyanın **fəallaşdırma enerjisi** adlanır. Fəallaşdırma enerjisi adətən $\Delta G^{\ddagger}$ ilə təmsil olunur, bu artıq müzakirə olunmuş Gibbs sərbəst enerjisində (ΔG) dəyişikliyin təmsil olunmasına analojidir. Atomların toplusu keçid vəziyyətindən ya enerjini əmələ gələn reaksiya məhsulu kimi azad edə bilir, ya da enerjini "geriyə istiqamətdə" qayıdan

atomlar kimi buraxa və orjinal reagentləri yenidən yarada bilir. Verilmiş şəraitlər dəsti (temperatur, təzyiq, reagentlərin qatılığı) altında reaksiyanın gedişi zamanı reagentlərdən reaksiya məhsullarının yaranma sürəti (V) keçid vəziyyətində olan materialın qatılığından asılı olacaq, hansıki o da öz növbəsində fəallaşma enerjisindən və keçid vəziyyətinin məhsula çevrildiyi xarakterik sürət konstantından (υ) asılı olacaq. Fəallaşma enerjisi yüksək olduqca reagentlərin keçid vəziyyətinə çatan fraksiyası də o qədər aşağı olur və reaksiyanın ümumi sürəti də o qədər aşağı olur. Reagentlərin qatılığı, υ və V arasında qarşılıqlı münasibət:

$V = \upsilon\,[\text{reagentlər}] \times 10^{-(\Delta G^{\ddagger} 2.3RT)}$ olacaq.



ŞƏKİL 2-30 Kataliz olunan və olunmayan kimyəvi reaksiyaların fəallaşma enerjisi. Belə fərz olunan reaksiya yolu (mavi) reaksiya davam etdikcə sərbəst enerji G-də dəyişməni təsvir edir. Əgər məhsulların sərbəst enerjisi (G) reagentlərinkindən az olarsa ($\Delta G<0$), o zaman reaksiya spontan baş verəcək. Amma bütün kimyəvi reaksiyalar bir (burada göstərilən) və ya daha artıq yüksək enerji keçidi ilə davam edəcək və reaksiyanın sürəti fəallaşma enerjisinə ($\Delta G^{\ddagger}$) tərs mütənasib olacaq, bu isə reagentlər və keçid vəziyyət arasında sərbəst enerjidəki fərqdir. Kataliz olunan reaksiyalarda (qırmızı) reagentlərin və məhsulların sərbəst enerjiləri dəyişilməzdilər, amma keçid vəziyyətin sərbəst enerjisi azalır və beləliklə reaksiyanın sürəti artir.

Bu tənlikdən biz görürük ki, keçid vəziyyətinin sərbəst enerjisinin, $\Delta G^{\ddagger}$ azalması olan fəallaşma enerjisinin aşağı enməsi ümumi reaksiya sürəti V-nin tezləşdirilməsinə səbəb olur. $\Delta G^{\ddagger}$-nin 1.36 kkal/mol qədər azalması reaksiyanın sürətini on dəfə artırdığı halda, 2.72 kkal/mol qədər azalması reaksiya sürətini 100 dəfə artırır. Beləliklə, $\Delta G^{\ddagger}$-də müqayisəli dərəcədə belə kiçik dəyişiklik reaksiyanın ümumi sürətində böyük dəyişikliyə səbəb olur.

Fermentlər kimi katalizatorlar (Fəsil 3-də daha ətraflı müzakirə olunur) keçid vəziyyətinin nisbi enerjisini və beləliklə də ona çatmaq üçün tələb olunan fəallaşma enerjisini azaltmaqla reaksiya sürətini tezləşdirir (bax Şəkil 2-30). Reagentlərin və məhsulların nisbi enerjisi reaksiyanın termodinamik cəhətdən əlverişli olmamasını (mənfi ΔG) təyin edir, amma fəallaşma enerjisi məhsulların necə sürətlə əmələ gəlməsini təyin edir – bu reaksiyanım kinetikasıdır. Əgər fəallaşma enerjisi çox yüksək olarsa termodinamik cəhətdən əlverişli reaksiyalar sərfəli sürətlə baş verməyəcək.

Həyat Energetik Cəhətdən Əlverişli Olmayan Kimyəvi Reaksiyaların Əlverişli Reaksiyalarla Birləşməsindən Asılıdır

Hüceyrədəki çox proseslər energetik cəhətdən əlverişli deyil ($\Delta G > 0$) və spontan baş verməyəcəklər. Buna aid misallara nukleotidlərdən DNT-nin sintezi və maddələrin plazma membrandan keçərək aşağı qatılıqdan yüksək qatılığa daşınması daxildirlər. Hüceyrələr enerj tələb edən və ya endogen reaksiyanı ($\Delta G_1 > 0$) onu enerji azad edən və ya eqzogen reaksiya ilə ($\Delta G_2 < 0$) birləşdirməklə və əgər iki reaksiyanın cəmi ümumi xalis mənfi ΔG olursa apara bilirlər.

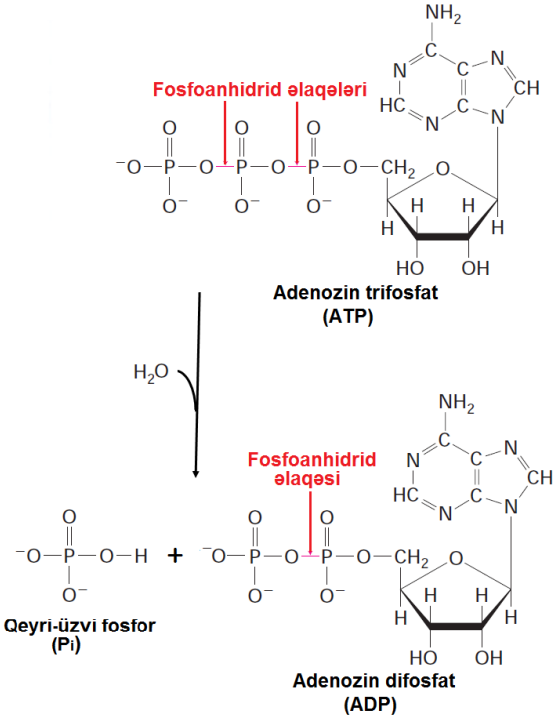
Məsələn, fərz edək ki, A $\rightleftharpoons$ B + X reaksiyası +5 kkal/mol ΔG malikdir və X $\rightleftharpoons$ Y + Z reaksiyası isə –10kkal/mol ΔG malikdir:

(1) A $\rightleftharpoons$ B + X ΔG = +5 kkal/mol

(2) X $\rightleftharpoons$ Y + Z ΔG = –10 kkal/mol

Cəm: A $\rightleftharpoons$ B + Y + Z $\Delta G^{o\prime}$ = –5 kkal/mol

İkinci reaksiya olmayan halda A tarazlıqda B-dən daha çox olmalıdır. Amma X-in Y + Z-ə çevrilməsi belə bir əlverişli reaksiya olduğundan, o birinci prosesi B-nin əmələ gəlməsi və A-nin istifadə olunması istiqamətində yönəldəcək. Hüceyrələrdə energetik cəhətdən sərfəli olmayan reaksiyalar bizim növbəti müzakirəmizdə olduğu kimi, tez-tez hallarda ATP-nin enerji ayrılan hidrolizi ilə birləşir.

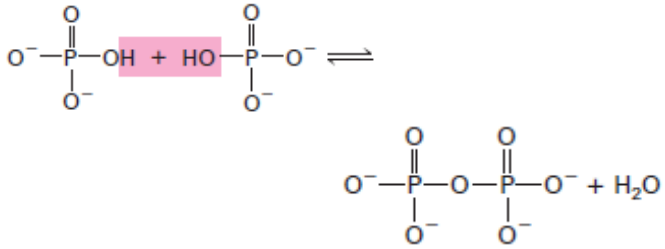


ŞIKİL 2-31 Adenozin trifosfatın (ATP) hidrolizi. ATP-də (*yuxarıda*) iki fosfoanhidrat rabirə (*qırmızı*) üç fosfat qrupunu bir yerə birləşdirir, hər biri hidroliz üçün təxminən 7.3 kkal/mol ΔG^{o} malikdirlər. Suyun əlavə olunması ilə terminal fosfoanhidrat rabitənin hidrolizi fosfatın azad olmasına ADP-nin yaranmasına səbəb olur. ATP-də fosfoanhidrid əlaqələrin və xüsusən də sonuncunun hidrolizi bioloji sistemlərdə çoxsaylı enerji tələb edən reaksiyaların aparılması üçün enerji mənbəyidir.

ATP-nin Hidrolizi Əhəmiyyətli Dərəcədə Sərbəst Enerjini Ayırır və Çoxsaylı Hüceyrə Proseslərini İdarə Edir

Demək olar ki, bütün orqanizmlərdə nukleozid trifosfat olan **adenozin trifosfat** və ya **ATP** (Şəkil 2-31), enerjinin tutulması, müvəqqəti saxlanılması və uyğun olaraq işi (məsələn, biosintez, mexaniki hərəkətləri və sair) yerinə yetirmək üçün ötürülməsini həyata keçirən ən əhəmiyyətli molekuldur. Ümumiyyətlə, hüceyrənin enerji "valyutası" kimi adlandırılan ATP hüceyrələrin öz fəaliyyətlərini həyata keçirmək üçün "xərclədikləri" istifadə oluna bilən enerji tipidir. ATP-nin əfsanəvi tarixi onun 1929-cu ildə aşkar olunması ilə başlandı, göründüyü kimi, eyni zamanda Almaniyada məşhur biokimyaçı Otto Meyerhofla işləyən Kurt Lohman, hansıki ilk dəfə nəşr etmişdir və ABŞ-da Sirus Fiske ilə Yellaqaparda SubbaRou tərəfindən birlikdə 1930-cu ildə kəşf olunmuşdur. 1930-cu illərdə aşkar edilmişdir ki, əzələ yığılması ATP-dən asılıdır. Hüceyrələrdə enerjinin ötürülməsi üçün ATP-nin əsas aralıq vasitəçi olması barədə ilk təklif 1941-ci ildə Fritz Lippman tərəfindən verilmişdir. ATP-nin və onun hüceyrənin enerji metabolizmində rolunun öyrənilməsi barədə çoxsaylı tədqiqatlar Nobel Mükafatına Layiq görülmüşdür və molekulyar hüceyrə biologiyasının anlaşılması barədə onun əhəmiyyəti danılmazdır.

ATP molekulunda faydalı enerji suyun itirilməsi ilə kondensasiya olunmuş iki fosfat molekulları arasında yaranan kovalent rabitəli **fosfoanhidrid əlaqələrində** saxlanılır:



Şəkil 2-31-də göstərildiyi kimi, ATP molekulu iki əsas fosfoanhidrid əlaqəsinə (fosfodiefir əlaqələri də adlanır) malikdir. ATP-də bu əlaqələrin formalaşması (burada ~ simvolu ilə işarələnir) enerjinin daxil olmasını tələb edir. Bu rabitələr hidroliz olunanda və ya suyun əlavə olunması ilə qırılanda həmin enerji ayrılır. Fosfoanhidrid əlaqələrin aşağıdakı hər bir reaksiyadakı hidrolizi yüksək mənfi –7.3 kkal/mol $\Delta G^{o\prime}$ malikdir.

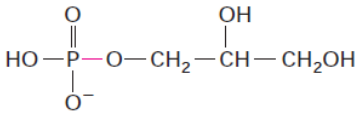
$$\underset{\text{(ATP)}}{Ap{\sim}p{\sim}p} + H_2O \rightarrow \underset{\text{(ADP)}}{Ap{\sim}p} + Pi + H^+$$

$$\underset{\text{(ATP)}}{Ap{\sim}p{\sim}p} + H_2O \rightarrow \underset{\text{(AMP)}}{Ap} + PPi + H^+$$

$$\underset{\text{(ADP)}}{Ap{\sim}p} + H_2O \rightarrow \underset{\text{(AMP)}}{Ap} + Pi + H^+$$

Bioloji sistemlərdə baş verən bu reaksiyalarda Pi qeyri-üzvi fosfatı (PO_4^{3-}) və PPi qeyri-üzvi pirofosfatı – fosfoanhidrid əlaqəsi ilə birləşmiş iki fosfat qrupunu göstərir. Yuxarıdakı iki reaksiyanın göstərdiyi kimi, fosfatın və ya pirofosfat qurupun ATP-dən uzaqlaşdırılması, uyğun olaraq adenozin difosfatı (ADP) və adenozin monofosfatı (AMP) yaradır.

Fosfoanhidrid əlaqələr və ya digər "yüksək-enerjili rabitə" (ümumilikdə ~ ilə işarə olunur) başqa kovalent rabitələrdən heç bir daxili fərqə malik deyillər. Yüksək enerjili rabitələr sadəcə olaraq hidroliz olunarkən kifayət qədər çox enerji azad edirlər. Məsələn, ATP-də fosfoanhidrid əlaqəsinin hidrolizi üçün $\Delta G^{o\prime}$ qiyməti (-7.3 kkal/mol) qliserin 3-fosfatın fosfodiefir əlaqəsinin (qırmızı) $\Delta G^{o\prime}$ qiymətindən (-2.2 kkal/mol) üç dəfədən artıq çoxdur.



Qliserin 3-fosfat

Bu fərqdə əsas səbəb ondan ibarətdir ki, ATP və onun hidroliz məhsulu ADP fə Pi neytral pH-da yüksək dərəcədə yüklüdürlər. ATP-nin sintezi zamanı ADP və Pi mənfi yüklərini bir yerə məcbur etmək üçün çoxlu miqdarda enerjinin daxil olması tələb olunur. ATP-nin ADP və Pi-a hidrolizi zamanı isə bu enerjinin azad olması baş verir. Müqayisədə qliserindəki yüksüz hidroksil qrupu ilə Pi arasında fosfodiefir əlaqəsinin formalaşması üçün az enerji tələb olunur və bu əlaqə hidroliz olunanda da az enerji azad olur.

Hüceyrələr fosfoanhidrid rabitələrin hidrolizindən ayrılan sərbəst enerjini başqa molekullara ötürmək üçün zülalla vasitələnən mexanizmi yaradıb inkişaf etdirmişlər, bununla da energetik cəhətdən əlverişsiz olan reaksiyanı həyata keçirmişlər. Məsələn, B + C → D reaksiyası üçün ΔG müsbətdirsə, amma ATP hidrolizinin ΔG qiymətindən azdırsa, o zaman reaksiya onu ATP-dəki sonuncu fosfoanhidrid rabitəsinin hidrolizi ilə birləşdirməklə sağ tərəfə gedəcək. Belə *enerji birləşməsinin* bir ümumi mexanizmində fosfoanhidrid rabitəsində saxlanılan enerjinin müəyyən hissəsi, ATP-dəki əlaqəni qırmaqla və azad olmuş fosfat qrupları ilə reagentlərdən biri arasında kovalent rabitəni yaratmaqla reagentlərdən birinə keçirilir (burada B). Bu yolla yaranan fosforlaşmış aralıq vasitəçi sonra reaksiyada C-ə təsir edə bilər və mənfi ΔG malik olan reaksiyada D + Pi yarada bilər.

$$B + Ap{\sim}p{\sim}p \rightarrow B{\sim}p + Ap{\sim}p$$

$$B{\sim}p + C \rightarrow D + Pi$$

Ümumi reaksiya

$$B + C + ATP \rightleftharpoons D + ADP + Pi$$

energetik cəhətdən əlverişli olacaq ($\Delta G < 0$). Buna oxşar olaraq GTP-nin GDP-yə hidrolizi də işi, o cümlədən ATP sintezini yerinə yetirmək üçün enerjini təmin edə bilir (bax Fəsil 12), amma əksər hallarda GTP hidrolizi enerji mənbəyi kimi istifadədən çox hüceyrə sistemlərinin (məsələn, zülalların sintezi, hormonal siqnal verilməsi) tənzimlənməsində istifadə olunur.

Enerji birləşməsi üçün alternativ mexanizm ATP hidrolizindən alınan enerjinin molekulun konformasiyasını "enerjiylə zəngin" gərgin vəziyyətə dəyişmək üçün istifadə olunmasıdır. Öz növbəsində konformasiya gərginliyi kimi saxlanılan enerji molekul geriyə, gərgin olmayan vəziyyətə "boşalanda" buraxıla bilir. Bu cür boşalma prosesi mexaniki olaraq başqa reaksiyaya birləşə bilir, azad olan enerji əhəmiyyətli hüceyrə proseslərinin aparılmasına qoşula bilər.

Çoxsaylı biosintetik reaksiyalar kimi molekulların hüceyrənin daxilinə və xaricinə daşınması tez-tez hallarda müsbət ΔG-yə malik olur və beləliklə prosesin davam etməsi üçün enerjinin daxil olması tələb edilir. Bu cür sadə daşınma reaksiyası kovalent rabitələrin qırılmasını və ya yaranmasını

birbaşa əhatə etmir, beləliklə, $\Delta G^{o\prime}$ 0-a bərabər olur. Maddə hüceyrə daxilinə keçən zaman 2-7 tənliyi:

$$\Delta G - RT \ln \frac{[C_{dax}]}{[C_{xar}]} \qquad (2\text{-}10)$$

kimi olur, burada $[C_{dax}]$ hüceyrə daxilində maddənin ilkin qatılığı və $[C_{xar}]$ maddənin hüceyrədən xaricdəki qatılıqdır. Biz 2-10 tənliyindən görə bilərik ki, maddənin hüceyrə daxilinə onun qatılıq qradientinin əksi istiqamətdə ($[C_{dax}] > [C_{xar}]$ olanda) daşınması üçün ΔG müsbət olur, bu cür "yoxuşa" gedən daşınma çox hallarda ATP hidrolizi ilə təmin olunur. Əksinə maddə qatılıq qradientinin azalan istiqamətində hərəkət edirsə, ($[C_{xar}] > [C_{dax}]$ olanda) ΔG mənfi olur. Bu cür "enişə" daşınma ilə azad olan enerji enerji-tələb edən reaksiya ilə məsələn, başqa maddənin membrandan yoxuşa doğru hərəkəti və ya ATP-nin özünün sintezi (bax Fəsil 11 və 12) ilə birləşə bilir.

ATP Fotosintez və Tənəfüs zamanı Yaranır

Çoxsaylı hüceyrə fəaliyyəti üçün ATP fasiləsiz surətdə hidroliz olunur. Bəzi hesablamalar göstərir ki, insan gün ərzində öz bədən çəkisinə bərabər ATP hidroliz edir. Aydındır ki, hüceyrələr fəalıyyətini davam etdirmək üçün fasiləsiz şəkildə ATP təminatını həyata keçirməlidir. Konstant şəkildə ATP-nin yenidən artırılması tələb edir ki, hüceyrələr ətraf mühitdən fasiləsiz şəkildə enerji əldə etsinlər. Demək olar ki, hüceyrələrin hamısı üçün ATP sintez etmək üçün başlıca enerji mənbəyi günəş işığıdır. Bəzi orqanizmlər günəş işığını birbaşa istifadə edə bilirlər. **Fotosintez** yolu ilə bitkilər, yosunlar və bəzi fotosintezedici bakteriyalar günəş işığının enerjisini tutaraq ADP və P_i-dan ATP sintez edirlər. Fotosintez ilə sintez olunan ATP-nin çoxu karbon iki-oksidin altıkarbonlu şəkərə çevrilməsini enerji ilə təmin etmək üçün hidroliz olunur və bu proses karbonun fiksasiyası adlanır:

$$6CO_2 + 6H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + H_2O + \text{energy}$$

Fotosintez zamanı yaranmış şəkərlər bitkilər və ya istehsal edən başqa fotosintezedici orqanizmlər üçün və qeyri-fotosintezedici orqanizmlər, məsələn bitki yeyən və ya bitki yeyən heyvanlarla qidalanan heyvanlar üçün qida mənbəyidir və beləliklə də enerji mənbəyidir. Bu yolla günəş işığı orqanizmlərin çoxunun birbaşa və ya dolayı yolla enerji mənbəyi rolunu oynayır (bax Fəsil 12).

Bitkilərdə, heyvanlarda və demək olar ki, bütün başqa orqanizmlədə qidadan alınmış şəkərdəki və başqa molekullardakı sərbəst enerji **qlikoliz** və **hüceyrə tənəfüsü** proseslərində ayrılır. Hüceyrə tənəffüsü zamanı qidada olan enerjiylə zəngin molekullar (məsələn, qlükoza) karbon iki oksidə və suya oksidləşir. Qlükozanın tam oksidləşməsi,

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

–6.86 kkal/mol qiymətində $\Delta G^{o\prime}$ malikdir və fotosintezdəki karbon tutulmasının əksinə olan prosesdir. Hüceyrələr 1 molekul qlükozanın oksidləşməsini 30-dan artıq ADP-dən 30-dan artıq ATP-nin sintezi ilə birləşdirmək üçün zülallar vasitəsilə həyata keçirilən reaksiyaları tətbiq edirlər. Heyvan hüceyrələrində, fotosintez etməyən bitki hüceyrələrində və çoxsaylı bakterial hüceyrələrdə qlükozanın oksigendən asılı olan (**aerob**) parçalanması (**katobalizm**) ATP-nin yaradılması üçün əsas yoldur. Yağ turşularının katobalizmi də həmçinin ATP-nin əsas mənbəyi ola bilər. Biz fotosintezin və hüceyrə tənəffüsünün mexanizmini Fəsil 12-də müzakirə edirik.

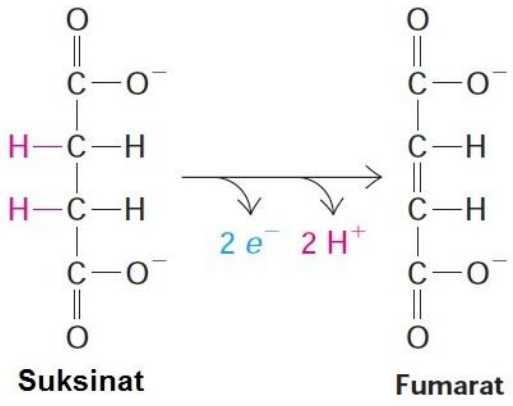
Hərçənd ki, fotosintez zamanı tutulmuş işıq enerjisi hüceyrə üçün kimyəvi enerjinin ilkin mənbəyidir, amma o yeganə mənbə deyildir. Adekvat günəş işığının mümkün olmadığı dərin okean sularında yaşayan bəzi mikroorqanizmlər ADP və P_i-u ATP-yə çevirmək üçün reduksiya olunmuş qeyri-üzvi maddələrin oksidləşməsindən geniş mənbə kimi istifadə edirlər. Bu reduksiya olunmuş mürəkkəb maddələr yerin dərinliklərində yaranır və okean dibindəki çıxışlardan buraxılır.

NAD^+ və FAD Çoxsaylı Bioloji Oksidləşmə və Reduksiya Reaksiyaları ilə Birləşir

Çox kimyəvi reaksiyalarda elektronlar bir atomdan və ya molekuldan digərinə keçirilir; belə keçirilmə yeni kimyəvi rabitələrin yaranması və ya başqa reaksiyalara birləşə bilən enerjinin ayrılması ilə müşayət oluna və ya olunmaya bilər. Atomdan və ya molekuldan elektronların itirilməsi **oksidləşmə** adlanır. Oksidləşməyə misal yuxarıda bölmə 2.2-də təsvir olunan, disulfid əlaqəsini yaradan iki sistein sulfhidril qruplara malik yan zəncirdən elektronların uzaqlaşdırılmasını göstərmək olar. Kimyəvi raksiyalarda elektronlar nə yaranır, nə də dağılmır, ona görə də bir atom və ya molekul oksidləşəndə digəri reduksiya olunmalıdır. Məsələn, karbohidratların mitoxondridə parçalandığı proses zamanı baş verən reaksiyaların birində oksigen Fe^{3+} (ferric) ionlarını yaratmaq üçün elektronları Fe^{2+} (ferrous) ionlarından alır. Hər bir oksigen atomu iki Fe^{2+} ionlarının hər birindən bir elektron olmaqla iki elektronu alır:

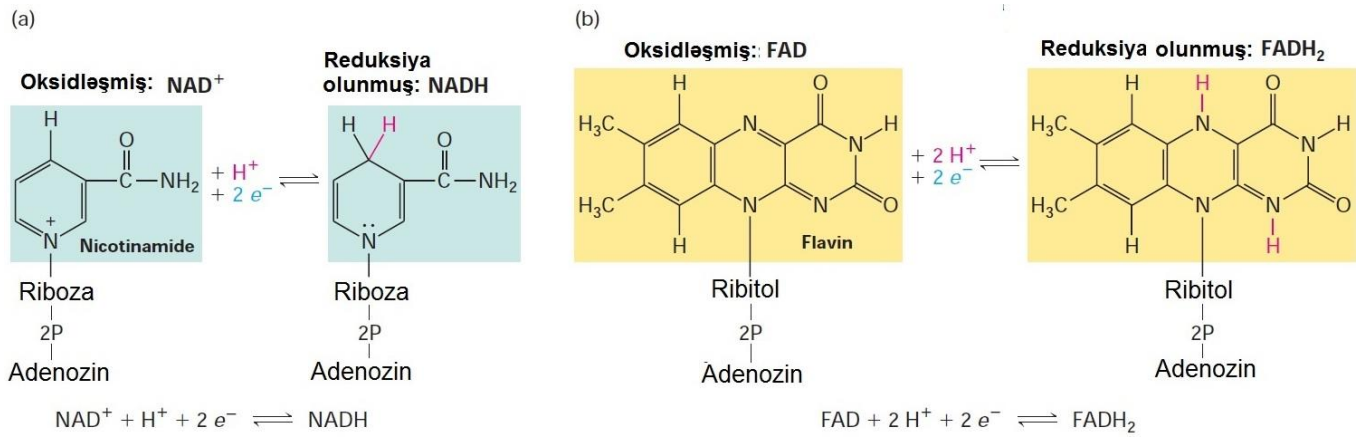
$$2\ Fe^{2+} + \tfrac{1}{2}\ O_2 \rightarrow 2\ Fe^{3+} + O^{2-}$$

Beləliklə Fe^{2+} oksidləşir və O_2 reduksiya olunur. Bir molekulun oksidləşdiyi və digərinin reduksiya olunduğu belə reaksiyalar **redoks** (**oksidləşmə-reduksiya**) **reaksiyaları** adlanır. Hüceyrədə aerob şəraitdə baş verən çoxsaylı redoks reaksiyalarında oksigen elektron akseptorudur.



ŞƏKİL 2-32 Suksinatın fumarata çevrilməsi. Mitoxondridə baş verən, limon turşusu tsiklinin bir hissəsi olan bu oksidləşmə reaksiyasında suksinat iki elektronu və iki protonu itirir. Onlar FAD-a keçərək onu $FADH_2$-ə reduksiya edirlər.

Bioloji cəhətdən əhəmiyyətli olan çoxsaylı oksidləşmə və reduksiya reaksiyaları ayrılmış elektonların özlərinə köçürülməsi əvəzinə hidrogen atomlarının (protonlar üstə gəl elektronlar) çıxarılması və ya əlavə edilməsini əhatə edirlər.



ŞƏKİL 2-33 Elektron daşıyan kofermentlər NAD^+ və FAD. (a) NAD^+ (nikotinamid adenin dinukleotid) eyni zamanda iki elektronun və bir protonun əlavə olunması ilə NADH-a reduksiya olunur. Çoxsaylı bioloji oksidləşmə-reduksiya reaksiyalarında bir cüt hidrogen atomları (iki proton və iki elektron) molekuldan uzaqlaşdırılır. Bəzi hallarda protonlardan biri və elektronların hər ikisi NAD^+ keçir; digər proton isə məhlula buraxılır. (b) FAD (flavin adenin dinukleotid) suksinat fumarata çevrilərkən iki elektronun və iki protonun əlavə olunması ilə $FADH_2$-ə reduksiya olunur (bax Şəkil 2-32). Bu ikimərhələli reaksiyada bir elektronun bir protonla birlikdə əlavə oluması əvvəlcə qısa ömürlü (az-davamlı) semixinon aralıq məhsulu əmələ gətirir (burada göstərilmir), sonra da ikinci elektronu və protonu qəbul edir.

Mitoxondridə baş verən reaksiyalardan suksinatın fumarata oksidləşməsi buna bir misaldır (Şəkil 2-32). Protonlar su məhlulunda həll ola bilirlər (H_3O^- kimi), amma elektronlar həll olmurlar, ona görə də onlar bir atomdan və ya molekuldan başqasına suda həll olan intermediat olmadan birbaşa ötürülməlidirlər. Bu tipli oksidləşmə reaksiyalarında elektronlar kiçik elektron daşıyıcı molekullara ötürülür, bəzən bunlara **kofermentlər (koenzimlər)** də deyilir. Belə çox yayılmış bioloji elektron daşıyıcısı **NAD^+ (nikotinamid adenin dinukleotid)** reduksiya olunaraq NADH çevrilir və **FAD (flavin adenin dinukleotid)**, reduksiya olunaraq $FADH_2$-ə çevrilir (Şəkil 2-33). Bu kofermentlərin reduksiya olunmuş formaları proton və elektronları başqa molekullara keçirərək onları reduksiya edirlər.

Dəmir (Fe^{2+}) ionlarının oksigenlə (O_2) reaksiysı kimi oksidləşmə-reduksiya reaksiyalarını təsvir etmək üçün asan yol onları iki yarım reaksiyalara bölməkdir:

$$Fe^{2+}\ \textit{oksidləşməsi}:\ 2Fe^{2+} \rightarrow 2Fe^{3+} + 2e^-$$

$$O_2\ \textit{reduksiyası}:\ 2e^- + \tfrac{1}{2}\,O_2 \rightarrow O^{2-}$$

Bu halda reduksiya olunmuş oksigen (O^{2-}) asanlıqla iki protonla reaksiyaya girir və bir molekul suyu (H_2O) əmələ gətirir. Atom və ya molekulların elektronları *qazanmağa* hazır olması onların **reduksiya potensialıdır** (***E***). Elektronları *itirmək* tendensiyası, **oksidləşmə potensialı** geriyə dönən reaksiyanın reduksiya potensialı ilə eyni, əks işarəli qiymətə malikdir.

Reduksiya potensialları standart şəraitdə (25 °C, 1 atm və 1 M reagentlər) reaksiyanın yarım-dövründə reduksiya potensialında müəyyən bir ixtiyari sıfır nöqtəsində voltla (V) ölçülür:

$$H^+ + e^- \underset{\text{oksidləşmə}}{\overset{\text{reduksiya}}{\rightleftharpoons}} \tfrac{1}{2}\,H_2$$

Molekul və ya atom üçün standart şəraitdə *E*-nin qiyməti standart reduksiya potensialıdır, E'_0. Müsbət E'_0-a malik olan molekul və ya ion elektronlara qarşı, H^+ ionlarının standart şəraitdə göstərdiyindən daha yüksək affinliyə malikdir. Əksinə mənfi E'_0-a malik olan molekul və ya ion elektronlara qarşı, H^+ ionlarının standart şəraitdə göstərdiyindən daha aşağı affinliyə malikdir. $\Delta G^{o\prime}$ qiymətlərində olduğu kimi, standart reduksiya potensialları hüceyrə daxilindəki şəraitdə olan standart reduksiya potensiallardan müəyyən qədər fərqlənirlər, çünki hüceyrə daxilində reagentlərin qatılığı 1 M deyildir.

Oksidləşmə-reduksiya reaksiyalarında elektronlar daha *yüksək müsbət* reduksiya potensialına malik olaraq atomlara və ya molekullara doğru spontan hərəkət edirlər. Başqa sözlə, molekul daha çox mənfi reduksiya potensialına malik olaraq elektronları spontan ötürə bilirlər və ya daha çox müsbət reduksiya potensialına malik olan molekulları reduksiya edirlər. Bu tip reaksiyalarda ΔE elektrik potensialındakı dəyişilmə iki yarım reaksiyalar üçün reduksiya və oksidləşmə potensiallarının cəmidir. Aşağıdakı tənliyə görə oksidləşmə-reduksiya reaksiyası üçün ΔE sərbəst enerji ΔG-nin dəyişilməsi ilə bağlıdır:

$$\Delta G\ (\text{kal/mol}) = -n\ (23064)\ \Delta E\ (\text{volt}) \qquad (2\text{-}11)$$

burada, *n* köçürülmüş elektronların sayıdır. Qeyd etmək lazımdır ki, müsbət ΔE malik olan oksidləşmə-reduksiya reaksiyaları mənfi ΔG-ə malik olacaq və beləliklə reaksiya spontan şəkildə soldan sağa doğru davam etməyə meyilli olacaq.

2.4 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSIYALARI

Biokimyəvi Energetika

- ΔG sərbəst enerjidə dəyişmə bioloji sistemlərdə spontan baş verən kimyəvi reaksiyaların potensialını proqnozlaşdırmaq üçün ən əhəmiyyətli ölçüdür. Kimyəvi reaksiyalar ΔG-nin mənfi olduğu istiqamətdə spontan davam etməyə meyillidirlər. ΔG-nin böyüklüyü reaksiya sürətindən asılı deyil. ΔG-si mənfi reaksiyalar termodinamik cəhətdən əlverişli reaksiyalar hesab edilir.
- Kimyəvi sərbəst enerji dəyişməsi $\Delta G^{o\prime}$, $-2.3\ RT \log K_{eq}$ bərabərdir. Beləliklə, $\Delta G^{o\prime}$ qiyməti reagentlərin və reaksiya

məhsullarının tarazlıqda eksperimental yolla təyin olunmuş qatılığından hesablana bilər.

- Reaksiyanın sürəti reagentlərin keçid vəziyyətnə keçməsini həyacanlandırmaq üçün tələb olunan fəallaşdırma enerjisindən asılıdır. Fermentlər kimi katalaizatorlar keçid vəziyyətinin fəallaşdırma enerjisini aşağı salmaqla reaksiyanı sürətləndirirlər.
- Müsbət ΔG-ə malik olan kimyəvi reaksiyalar yüksək ölçüdə mənfi ΔG-ə malik olan reaksiya ilə birləşdikdə davam edə bilir.
- Energetik cəhətdən əlverişsiz olan bir sıra hüceyrə prosesləri ATP-dəki fosfoanhidrid rabitələrin hidrolizi ilə idarə olunur (bax Şəkil 2-31).
- Bitkilərdə, yosunlarda, fotosintezedici bakteriyalarda fotosintez zamanı tutulmuş işıq enerjisi birbaşa və ya dolayı yolla yer üzündəki bütün hüceyrələrdə kimyəvi enerjinin əsas mənbəyidir
- Oksidləşmə reaksiyası (elektronların itirilməsi) həmişə reduksiya reaksiyaları ilə (elektronların qazanılması) birləşir.
- Bioloji oksidləşmə və reduksiya reaksiyaları tez-tez hallarda NAD^+ və FAD kimi elektron daşıyan kofermentlərlə birləşirlər (bax Şəkil 2-33).
- Müsbət ΔE-ə malik olan oksidləşmə-reduksiya reaksiyaları mənfi ΔG-ə malik olurlar və beləliklə spontan davam etməyə meyilli olurlar.

Açar Sözlər

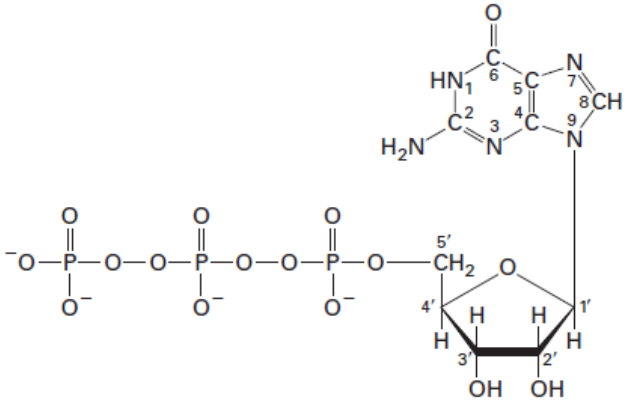
ΔG (sərbəst enerjis dəyişməsi)
adenozin trifosfat (ATP)
amfipatik
amin turşusu
bufer
dehidrasiya reaksiyası
dipol
Dissosasiya konstantrı (K_d)
disulfid əlaqə
doymamış
doymuş
eqzogen
eqzotermik
endogen
endotermik
enerji birləşməsi (cütləşməsi)
entalpiya
entropiya
əsas
fosfoanhidrid əlaqə (rabitə)
fosfoqliserid
fosfolipid ikiqatlı
hidrofil
hidrofob
hidrofob effekt
hidrogen əlaqəsi
ion qarşılıqlı təsir
katalizator
keçid vəziyyət
kimyəvi potensial enerji
kovalent rabitə
qeyrikovalent qarşılıqlı təsir
molekulyar komplementarlıq
monomer
monosaxarid
nukleotid
nukleozid
oksidləşmə
oksidləşmə-reduksiya reaksiyası
pH
polimer
polyar
reduksiya
sabit vəziyyət
stereoizomer
tarazlıq konstantı
turşu
van der Vaals qarşılıqlı təsir
yağ turşusu
α karbon atomu (C_α)

Konsepsiyalara Baxış

1. Geko (kərtənkəllərdən) sürünənlərə aid olub şüşə kimi hamar səthlərlə heyrətləndirici dərəcədə dırmaşmaq qabliyyətinə malikdir. Son zamanların tədqiqatları göstərdi ki, gekolar hamar səthə ayaqlarındakı pərdələrlə hamar səth arasındakı van der Vaals qarşılıqlı əlaqələri ilə yapışırlar. Yapışqanlığın bu metodu kovalent qarşılıqlı təsirə nisbətən hansı üstünlüyə malikdir? Van der Vaals qüvvələrinin ən zəif qarşılıqlı əlaqələr arasında olması şərti ilə gekonun ayaqları necə olur ki, belə effektiv yapışır?
2. K^+ kanalı (plazma membranın fosfolipid iki qatlısına sarınan zülal) transmembran zülallarına aid olan bir nümunədir. Hansı tipli amin turşuları: (a) K^+ membrandan keçdiyi kanalı əhatə edən hissəsində, (b) yağ turşusu asil qruplarına malik olan fosfolipid ikiqatlısının hidrofob özəyi ilə əlaqədə olan hissəsində, (c) zülalların sitozol domenində və (d) zülallın hüceyrəxarici domenində tapılmışdır?
3. V-M-Y-F-E-N: Bu peptidlərdə amin turşularını bir hərflə işarə olunan qısaldılmasıdır. pH 7.0-da bu peptidin xalis yükü necə olacaq? Tirozinkinaza adlanan ferment fosfat qurupunu tirozinin hidroksil qurupuna birləşdirir. Tirozinkinaza ilə fosforlaşdıqdan sonra pH 7.0-də peptidin xalis yükü necə olacaq? Bu reaksiya üçün kinazanın istifadə etdiyi fosfatın güman olunan mənbəyi nədir?
4. Disulfid əlaqələri zülalların üçölçülü quruluşunun stabilləşdirilməsinə kömək edir. Disulfid əlaqələrin yaranmasında hansı amin turşuları iştirak edirlər? Disulfid əlaqəsinin yaranması entropiyanı (ΔS) artırıb-azaldırmı?
5. 1960-cı illərdə talidomid dərmanını hamilə qadınlara səhər öğümələrinə qarşı müalicə kimi təyin etmişdilər. Amma talidomid bu dərmanları qəbul edən bəzi qadınların uşaqlarının əzalarında kəskin qüsurların yaranmasına səbəb olmuşdur və

ona görə də onun səhər ögümələrinin müalicəsində istifadəsi dayandırılmışdır. İndi məlum olmuşdur ki, talidomid iki stereoizomer komponentin qarışığından ibarətdir və bunlardan biri səhər ögümələrinin müalicəsində cavabdehdir, digər isə doğum qüsurlarının yaranmasına səbəb olur. İzomerlər nədir? Nəyə görə bir-birinə bu qədər yaxın olan birləşmələr bu qədər fizioloji fərqlərə malik olurlar?

6. Burada göstərilən birləşmənin adını deyin.



Bu nukleotid DNT-nin yoxsa RNT-nin komponentidirmi, ya hər ikisininmi? Bu birləşmənin başqa funksiyasını da deyin.

7. Qan qurupunun spesifikliyinin kimyəvi əsasları qırmızı qan hüceyrələrinin səthində biruzə verən karbohidratlara məxsusdur. Karbohidratlar geniş quruluş müxtəlifliyi potensialına malikdirlər. Həqiqətən də dörd şəkərdən formalaşa bilən oliqosaxaridlərin quruluş mürəkkəbliyi dörd amin turşusunun əmələ gətirə biləcəyi oliqopeptidlərin quruluş mürəkkəbliyindən çox-çox böyükdür. Karbohidratların hansı xüsusiyyəti bu cür mürəkkəbliyin yaranmasını mümkün edir?

8. 1 L təmiz suyun tarazlıqda pH-nı hesablayın. 0.008 mol güclü NaOH suda həll edilərkən pH necə dəyişiləcək? Zəif turşu 3-(N-morfolin) propan 1-sulfonun (MOPS) 61% məhlulu zəif turşu şəkilindədir, 39% isə MOPS konyuqasiyalı əsas şəkilindədir (pK_a MOPS üçün 7.2-dir) MOPSun 50mM su məhlulunun pH-nı necə hesablamaq olar? 0.008 mol NaOH 1L MOPS buferinə əlavə olunanda son pH necə olacaq?

9. Amonyak (NH_3) zəif əsasdır, turş şəraitdə aşağıdakı reaksiya ilə ammonium ionlarına protonlaşır:

$NH_3 + H^+ \rightarrow NH_4^+$

NH_3 bioloji membranlardan, o cümlədən lizosom membranlarından asanlıqla keçir. Lizosomlar pH-ı 4.5 – 5.0 ətrafında olan hüceyrədaxili orqanoidlərdir, sitoplazmanın pH-ı isə ~7.0-dir. Lizosomların maye tərkibinin pH-na hüceyrənin amonyaka məruz qoyulması necə təsir edəcək? *Qeyd*: Protonlaşmış amonyak membrandan asanlıqla diffuziya edib keçmir.

10. Hesab edək ki, birləşmə reaksiaysı L + R → LR, burada L liqand, R isə reseptordur. Tərkibi 5×10^{-2} R olan məhlula 1×10^{-3} M L əlavə edilərkən L-in 90%-i LR birləşməsini əmələ gətirir. Reaksiyanın K_{eq} nədir? Bu birləşmə reaksuyasını kataliz edən (sürətləndirən) zülalın əlavə olunması K_{eq}-ə necə təsir edəcək? Dissosasiya tarazlığı konstantı K_d nədir?

11. Sitoplazmada fosfat turşusunun ionlaşma vəziyyəti nədir? Nəyə görə fosfat turşusu fizioloji cəhətdən belə əhəmiyyətlidir?

12. $\Delta G^{o\prime}$ X + Y → XY reaksiyası üçün –1000 kal/mol-dur. X, Y və XY hər birinin başlanğıc qatılılğı 0.01 M olan halda, 25ºC-də (298 Kelvin) ΔG nəyə bərabər olacaq? İki yolu təklif edin ki, bunlardan biri reaksiyanı energetik cəhətdən əlverişli etsin.

13. Sağlamlıq ekspertlərinə görə heyvan piylərindən alınan doymuş yağ turşuları ürəyin tac damarının infarktının əsas yaradıcısıdır. Doymuş yağ turşularının doymamış yağ turşularından fərqi nədir və *doymuş* sözü nəyi bildirir? Son zamanlar bədəndə xolesterinin miqdarını artıran trans-doymamış yağ turşuları və ya trans piylərin ürək xəstəliklərində iştirakı aşkar olunmuşdur. ***cis*** stereoizomer trans konfiqurasiyadan necə fərqlənir və yağ turşusu zəncirinin quruluşuna ***cis*** konfuqurasiyası necə təsir edir?

14. Amin turşularının kimyəvi modifikasiyası zülalların geniş fəaliyyətinə və müxtəlifliyinə kömək edir. Məsələn, bəzi zülalların bioloji fəal olması üçün onlarda spesifik amin turşularının γ-karboksillşməsi tələb olunur. Hamsı xüsusi amin turşusu bu modifikasiyaya uğrayır və onun bioloji münasibliyi nədən ibarətdir? Müxtəlif bitkilərdə mövcud olan kumarinin törəməsi varfarin bu amin turşusunun γ-karboksillşməni ingibirləşdirir və keçmişdə siçovul zəhəri kimi istifadə olunurdu. Hal-hazırda o kliniki cəhətdən insanlarda da istifadə olunur. Hansı xəstələrə vorfarin məsləhət görünür və nə üçün?

İstinadlar

Alberty, R. A., and R. J. Silbey. 2005. *Physical Chemistry*, 4th ed. Wiley.

Atkins, P., and J. de Paula. 2005. *The Elements of Physical Chemistry*, 4th ed. W. H. Freeman and Company.

Berg, J. M., J. L. Tymoczko, and L. Stryer. 2007. *Biochemistry*, 6th ed. W. H. Freeman and Company.

Cantor, P. R., and C. R. Schimmel. 1980. *Biophysical Chemistry*. W. H. Freeman and Company.

Davenport, H. W. 1974. *ABC of Acid-Base Chemistry*, 6th ed. University of Chicago Press.

Eisenberg, D., and D. Crothers. 1979. *Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences*. Benjamin-Cummings.

Guyton, A. C., and J. E. Hall. 2000. *Textbook of Medical Physiology*, 10th ed. Saunders.

Hill, T. J. 1977. *Free Energy Transduction in Biology*. Academic Press.

Klotz, I. M. 1978. *Energy Changes in Biochemical Reactions*. Academic Press.

Murray, R. K., et al. 1999. *Harper's Biochemistry*, 25th ed. Lange.

Nicholls, D. G., and S. J. Ferguson. 1992. *Bioenergetics 2*. Academic Press.

Oxtoby, D., H. Gillis, and N. Nachtrieb. 2003. *Principles of Modern Chemistry*, 5th ed. Saunders.

Sharon, N. 1980. Carbohydrates. *Sci. Am.* **243**(5):90–116.

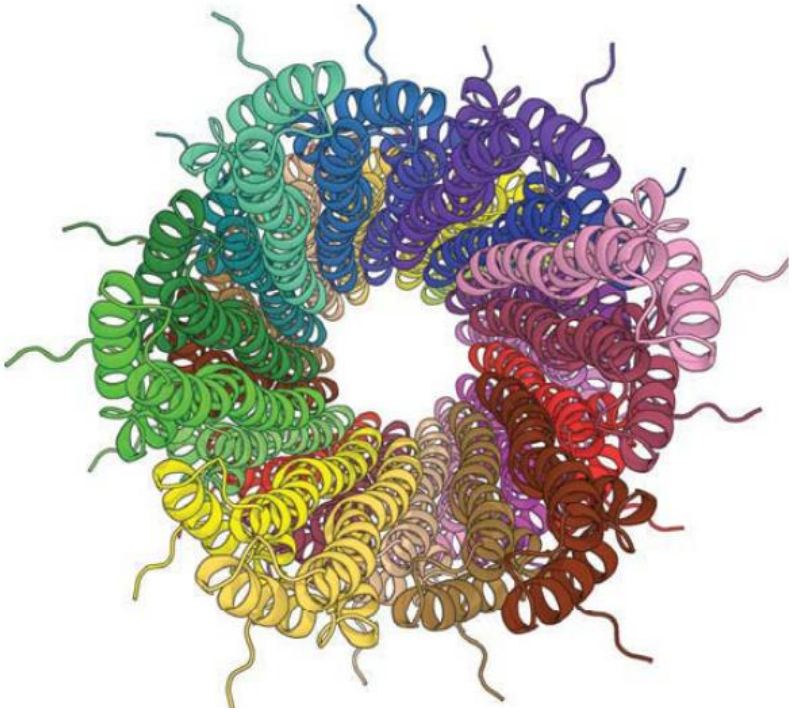
Tanford, C. 1980. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, 2d ed. Wiley.

Tinoco, I., K. Sauer, and J. Wang. 2001. *Physical Chemistry—Principles and Applications in Biological Sciences*, 4th ed. Prentice Hall.

Van Holde, K., W. Johnson, and P. Ho. 1998. *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice Hall.

Voet, D., and J. Voet. 2004. *Biochemistry*, 3d ed. Wiley.

Wood, W. B., et al. 1981. *Biochemistry: A Problems Approach*, 2d ed. Benjamin-Cummings.



Patogen bakteriyaların yoluxmanı başlamaq üçün zülallarını insan hüceyrəsinə inyeksiya etmək üçün istifadə etdiyi zülal "iynənin" molekulyar lent modeli. Xəstəlik-əmələ gətirən çox bakteriyalar, o cümlədən *Salmonella tiphimurium* (qidanı zəhərləyən) və *Yersinia pests* (bubonik vəba), zülalları öz məməli hədəf hüceyrələrinə inyeksiya etmək üçün III tip ifrazat sistemi adlanan şprisə-bənzər zülal kompleksindən istifadə edirlər. *Salmonella tiphimurium*-un istifadə etdiyi şprisin iynə hissəsinin nüvə maqnit rezonansı (NMR), elektron mikroskopiyası və kompüter metodlarının birgə istifadə olunması ilə təyin edilmiş quruluşu çoxsaylı α spirallara malik olan uzun borucuq (spirallaşmış lent təsvir edilir) olub iynənin divarlarını əmələ gətirir. [Verilənlər A. Loquet et al., 2012, *Nature* **486**:276, PDB ID 2İpz.]

FƏSİL
3

ZÜLALLARIN QURULUŞU VƏ FUNKSIYASI

Amin turşularının polimeri olan zülallar çoxsaylı müxtəlif formada və ölçüdə olurlar. Onların üç-ölçülü quruluşunun müxtəlifliyi özünü əsasən onların uzunluğunda və aminturşu ardıcıllığında əks etdirir. Ümumiyyətlə, istənilən zülalın tərkib hissəsi olan, amin turşularının xətti, şaxələnməyən polimeri yalnız bir neçə, bir-birinə çox yaxın olan üç-ölçülü formada bükülür, buna **konformasiya** deyilir. Zülalın konformasiyası onu təşkil edən amin turşularının yan zəncirlərinin müxtəlif kimyəvi xassələri ilə birlikdə zülalın funksiyasını təmin edir. Bəzi hallarda, zülalın konformasiyası və beləliklə onun funksiyası zülal başqa molekullarla kovalent və ya qeyri kovalent assosasiyada olanda dəyişilə bilir. Formalarının və kimyəvi xassələrinin çoxluğuna görə zülallar hüceyrənin daxilində və xaricində heyrətləndirici dərəcədə çoxsaylı müxtəlif funksiyaları həyata keçirirlər, bunlar ya həyati əhəmiyyətlidir, ya da hüceyrələr və ya onların təşkil etdiyi orqanizm üçün selektiv təkamül üstünlüyünü təmin edir. Ona görə də təccüblü deyil ki, hüceyrənin necə fəaliyyət göstərməsini anlamaq üçün zülalların fəallığının və xüsusiyyətlərinin öyrənilməsi əsas və fundamental tələbdir. Bu dərsliyin çox hissəsi, hüceyrənin yaşamasını və düzgün fəaliyyətini təmin etmək üçün zülalların necə birlikdə fəaliyyət göstərmələrinin öyrənilməsinə həsr olunub.

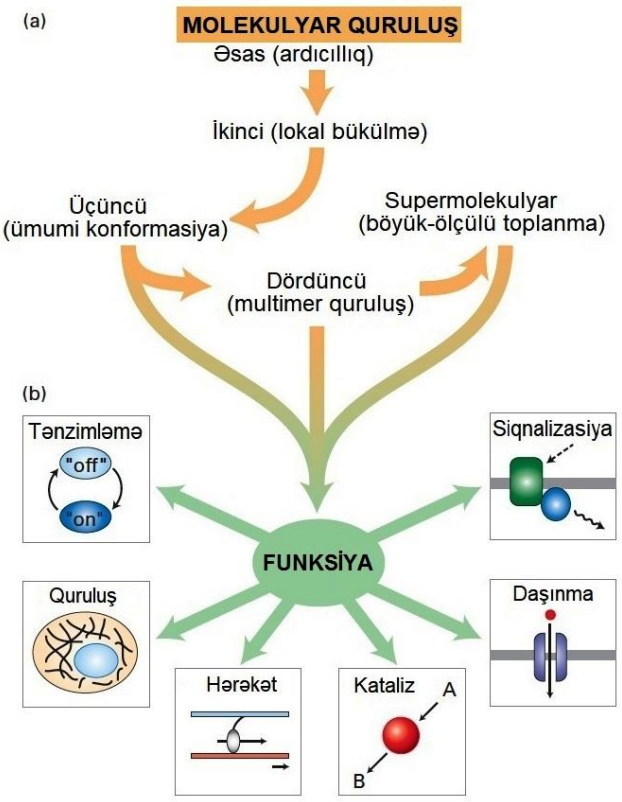
Baxmayaraq ki, zülalların quruluş müxtəlifliyi genişdir, amma fərdi zülalların çoxu bir neçə geniş funksional siniflərin birində qruplaşdırıla bilirlər. Məsələn, ***quruluş zülalları*** hüceyrənin formasını, onun hüceyrəxarici mühitini müəyyən edir və bələdçi xətt (naqil) kimi və ya rels kimi xidmət edərək molekulların və ya orqanoidlərin hüceyrə daxili hərəkətini istiqamətləndirirlər. Adətən onlar, müxtəlif zülal subvahidlərinin çox böyük, uzun bir quruluşda yığılmasından formalaşırlar. ***Skafold zülallar*** başqa zülalları, onların xüsusi funksiyalarının bir yerdə olmadıqları hala nisbətən daha səmərəli yerini yetirilməsi üçün bir yerə gətirib nizamlı düzülüşünü yaradır. ***Fermentlər*** zülallar olub kimyəvi reaksiyaları kataliz edirlər. ***Membran transport zülallar***ı ionların və molekulların hüceyrə membranından keçməsini təmin edir. ***Tənzimləyici zülallar*** başqa zülalların və genlərin funksiyasını dəyişməklə hüceyrənin fəaliyyətinə nəzarət etmək üçün siqnallar, sensorlar və keçiricilər kimi fəaliyyət göstərirlər. Tənzimləyici zülallara hüceyrəxarici siqnalları hüceyrə daxilinə keçirən hormonlar və hüceyrə səth reseptorları kimi *siqnal zülalları* daxildirlər. ***Motor zülallar*** molekulların, orqanoidlərin, hüceyrələrin, hətta bütöv orqanizmin hərəkətini həyata keçirirlər. İstənilən bir zülal birdən artıq sinifin nümayəndəsi ola bilir, bu hüceyrə səth siqnal reseptorlarından görünür, onlar həm ferment həm də tənzimləyici zülallardır, çünki onlar kimyəvi reaksiyaları kataliz etməklə siqnalların hüceyrə xaricindən daxilinə ötürülməsini həyata keçirirlər. Bəzi zülallar öz geniş müxtəliflikdə missiyalarını daha səmərəli şəkildə həyata keçirmək üçün, çox hallarda ***molekulyar maşın*** adlandırılan böyük komplekslərdə toplanırlar.

Q I S A İ C M A L

3.1 Zülalların Quruluşunda Ierarxiya
3.2 Zülalların Bükülməsi
3.3 Zülalın Birləşməsi və Fermentativ Kataliz
3.4 Zülalların Funksiyasının Tənzimlənməsi
3.5 Zülalların Təmizlənməsi, Aşkar Edilməsi və Xarakterizə Olunması
3.6 Proteomiks

Zülallar bu qədər müxtəlif funksiyanı necə yerinə yetirirlər? Onlar bunu, bir neçə sadə fəaliyyətdən istifadə etməklə yerinə yetirirlər. Ən əsası odur ki, zülallar bir birinə ***birləşirlər***, DNT kimi başqa makromolekullara birləşirlər, həmçinin kiçik molekullara və ionlara birləşirlər. Çox hallarda bu cürə birləşmə zülallarda onun fəallığına təsir edən konformasiya dəyişilməsini (üç-ölçülü quruluşun dəyişilməsi) induksiya edir. Birləşmə, Fəsil 2-də təsvir olunduğu kimi, zülallarla onların birləşdiyi partnyor komponentlər arasındakı molekulyar komplementarlığa əsaslanır. İkinci əsas fəallıq onların ***fermentativ kataliz*** xüsusiyyətidir. Zülalların müvafiq bükülməsi onlarda bəzi aminturşu yan zəncirlərini, həmçinin karboksil və amin qruplarını zülalın özül zəncirindən kənara elə vəziyyətdə çıxarır ki, onlar kovalent rabitələrin yenidən qurulmasını kataliz edə bilrlər. Üçüncü fəllığa zülalların ***membran məsamələrində və ya kanalda bükülüb yığılmasıdır*** ki, buradan başqa molekulların və ya ionların keçib getməsinə imkan yaradırlar. Hərçənd ki, bütün bunlar zülalların xüsusilə əhəmiyyəyli fəaliyyətlərinə aiddirlər, amma zülalların fəaliyyəti tək bunlardan ibarət deyildir. Məsələn soyuq sularda yaşayan balıqlar - Antarktika borxlarının və ya şimal buzlu okeanda yaşayan treska balıqlarının orqanizmlərində olan dövrəedici maye sistemlirində su kristallaşmasına qarşı antifriz zülallar vardır.

Zülalların hüceyrənin necə yaşamasına və inkişaf etməsinə imkan verələrini tam başa düşmək üçün hüceyrələr tərəfindən istifadə olunan bütün zülalların identifikasiyası və xassələrinin öyrənilməsi tələb olunur. Bu səbəbdən molekulyar hüceyrə bioloqları istəyirlər ki, tam zülal "hissələrinin siyahısını" tərtib etsinlər və "istifadəçilər üçün təlimat (dərslik)" yaratsınlar və göstərsinlər ki, bu zülallar necə fəaliyyət göstərirlər. Zülalların tam geniş siyahısının tərtib olunması, son illərdə mövcud olan tam **genomun** ardcllığının oxunması - getdikcə daha artıq orqanizmlərdə genlərin tam dəstinin nukleotid ardıcıllıqlarının getdikcə daha artıq orqanizmlərdə analizi ilə mümkün olmuşdur. Tədqiqatçılar genom sekvensinin kompüter analizindən zülalın aminturşu ardıcıllığını təyin edərək kodlaşdırılan zülalların sayını da təyin edə bilirlər (bax Fəsil 6). **Proteom**o sözü yeni termin kimi **orqanizmdə** olan **mövcud** zülalların tam dəstini təsvir etmək üçün yaranmışdır. İnsanın genomu təxminən 20000-23000 zülal codlaşdıran genə malikdir. Amma, mRNT istehsalındakı variasiyalar, məsələn alternativ splaysinq (bax Fəsil 10) və 100-dən artıq müxtəlif zülal modifikasiyaları insan orqanizmində yüz minlərlə müxtəlif zülalların yaranmasına (sintezinə) səbəb olur. Alimlər funksiyası məlum olmayan zülalların aminturşu ardıcıllıqlarını və quruluşlarını funksiyası məlum olan zülallarınkı ilə müqayisə edərək bu zülalların hansı funksiyanı yerinə yetirdiklərini təyin edə bilirlər. Əvəllər zülal funksiyalarının genetik, biokimyəvi və fizioloji metodlarla öyrənilməsi ayrı-ayrı zülalların təyin olunmasını (identifikasiyasını) qabaqlayırdı. Müasir genomiks və proteomiks erasında zülal onun funksiyası təyin olunana qədər artıq identifikasiya olunur.



Şəkil 3-1 Zülalların quruluşunun və funksiyalarının ümumi icmalı. (a) Zülallar ierarxik quruluşua malikdirlər. Polipeptidlərin amin turşularının peptid əlaqələri ilə birləşmiş xətti ardıcıllıqları (ilkin və ya birinci quruluş) lokal spirallar və ya qatlanmış vərəqlər (təbəqələr) şəklində bükülür (ikinci quruluş) və sonda üç-olçülü fəza formasında yığılırr (üçüncü quruluş). Bəzi fərdi polipeptidlər çoxzəncirli kompleks şəkilində birləşirlər (dördüncü quruluş), və bu komplekslər bəzən həddən artıq böyük olub onlarla və ya yüzə qədər müxtəlf subvahidlərdən təşkil olunurlar (supermolekulyar kompleks). (b) Zülallar müxtılif funksiyanı, yerinə yetirirlər, o cümlədəın genomun, orqanoidlərin, sitoplazmanın, zülallar komplekslərinin və membranın üç-ölçülü fəza quruluşunun təşkili (quruluş funksiyası); zülalların fəaliyyətinə nəzarət (tənzimləmə funksiyası); ətraf mühitin təsirinin müəyyən olunması (monitorinqi) və informasiyanın ötürülməsi (siqnal funksiyası); kiçik molekulların və ionların membrandan keçərək ötürülməsi (nəqliyyat funksiyası); kimyəvi reaksiyaların kataliz oluması (fermentlər vasitəsi ilə); və hərəkət üçün gücün yaradılması (motor zülallarla). Bu funksiyalar və başqaları düzgün bükülmüş zülallarda xüsusi birləşmə əlaqələri və konformasiya dəyişilmələri hesabına baş verir.

Bu fəsildə, tədqiqatlarımızı zülalların quruluşunun onların funksiyasını necə yaratması ilə başlayırıq, bu mövzuya bütün kitab boyu təkrar-təkrar qayıdırıq (Şəkil 3-1). Birinci bölmə amin turşularının xətti zəncirinin üç-ölçülü quruluş iyerarxiyasında necə düzülməsini öyrənir. Növbəti bölmədə zülalların bu quruluşda necə bükülməsi müzakirə olunur. Sonra

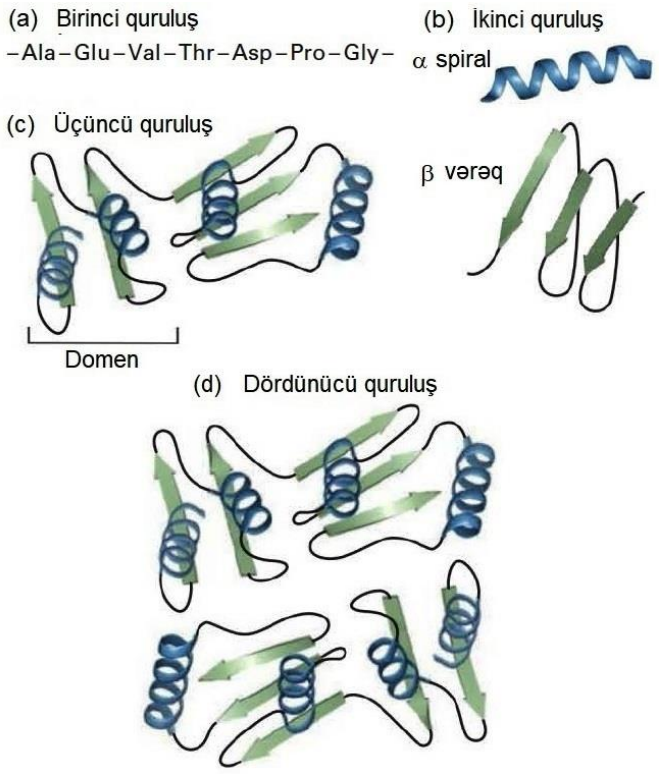
isə, biz diqqətimizi kimyəvi reaksiyaları kataliz edən fermentlərin öyrənilməsinə cəmləyərək, zülalların funksiyasının müzakirəsinə keçirik. Zülalların qısa həyat dövrünün və fəaliyyətinin nəzarəti üçün hüceyrələrin istifadə etdiyi müxtəlif mexanizmlərin öyrənilməsi növbəti bölmədə verilmişdir. Bu fəsilin sonuncu bəlməsi zülalların identifikasiyası, ayrılması və xarakterizə oluması üçün istifadə olunan metodları, o cümlədən proteomiksin çiçəklənən sahələrinin müzakirəsini əhatə edir.

3.1 Zülalların Quruluşunda İerarxiya

Zülal zənciri fərqli üç-ölçülü formada bükülür, bu əsasən amin turşularının xətti ardıcıllığında nahiyələr arasındakı qeyri kovalent qarşılıqlı əlaqələr hesabına stabilləşir. Zülalların necə işləməsinin başa düşülməsindəki əsas anlayış (concepsiya) ondan ibarətdir ki, *funksiya çox zaman üç-ölçülü quruluşdan əmələ gəlir, üç-ölçülü quruluş isə həm zülalın aminturşu ardıcıllığı, həm də molekulıdaxili qeyri kovalent rabitələr hesabınə əmələ gəlir*. Bioloji quruluş və funksiyaya aid olan əsas prinsiplər ilk dəfə, işləri biologiya və ona yaxın olan sahələrin inkişafına böyük töhfə verən bioloqlar Johann von Goerth (1749-1832), Ernst Haeckel (1834-1919) və D'Arcy Thompson (1860-1948) tərəfindəm hazırlanmışdır. Həqiqətən də onların ideyaları iyirminci əsirin əvvəllərində meydana gəlmiş "üzvi" arxitektura məktəbinə böyük təsir etmiş, söylənilmiş "formanın ardınca funksiya gəlir" (Louis Sullivan) və "forma funksiyadır" (Frank Lloyd Wright) kimi kəlamlarla qısa şərh olunmuşdur. Biz burada zülalların quruluş arxitekturasının dörd səviyyədə təşkilini: birinci, ikinci, üçüncü və dördüncü quruluş səviyyələrində müzakirə edəcəyik (Şəkil 3-2).

Zülalların Birinci Quruluşu Amin Turşusu Ardıcıllığının Xətti Düzülüşüdür

Fəsil 2-də müzakirə olunduğu kimi, zülallar 20 müxtəlif tipli amin turşularından qurulmuş polimerlərdir. Fərdi amin turşuları xətti şəkildə, şaxələnməmiş zəncirdə bir-biri ilə kovalent rabitə ilə **peptid əlaqələri** adlandırılan amid əlaqələri ilə birləşirlər. Bir amin turşusunun amin qrupu ilə digər amin turşusunun karboksil qrupu arasınad peptid əlaqəsinin əmələ gəlməsi nəticəsində reaksiyadan təmiz bir molekul su ayrılır, ona görə bu raksiya susuzlaşdırma və ya dehidrasiya reaksiyası adlanır (Şəkil 3-3a). Hər bir amin turşusu qalığının amid N, α karbon (C_α), karbonil C və oksigen atomlarının təkrarlanan ardıcıllığı zülal molekulunun **özülünü** (**backbone**) əmələ gətirir, bu özüldən amin turşularının yan zşncir qrupları asıllr (Şəkil 3-3 b,c). Peptid əlaqələrinin nəticəsi olaraq zülal zəncirinin özülü istiqamətlənmiş şəkildə, və adətən N-dan C-a doğru istiqamətlənmiş olur, çünki bütün amin qrupları C_α atomundan eyni istiqamətdə yerləşir. Beləliklə bütün zülalların bir ucu sərbəst, birləşməmiş amin qrupuna (*N-sonluq*) başqa bir ucu isə sərbəst karboksil qrupuna (*C-sonluq*) malikdir. Ona görə də, zülal zəncirinin aminturşu ardıcıllığı ənənəvi olaraq N-sonluq sol tərəfdə olmaqla, C-sonluq isə sağ tərəfdə olmaq şərti ilə düzülərək yazılır və amin turşularının ardıcıl nömrələnməsi amin ucluğundan (N-sonluqdan) başlayir.

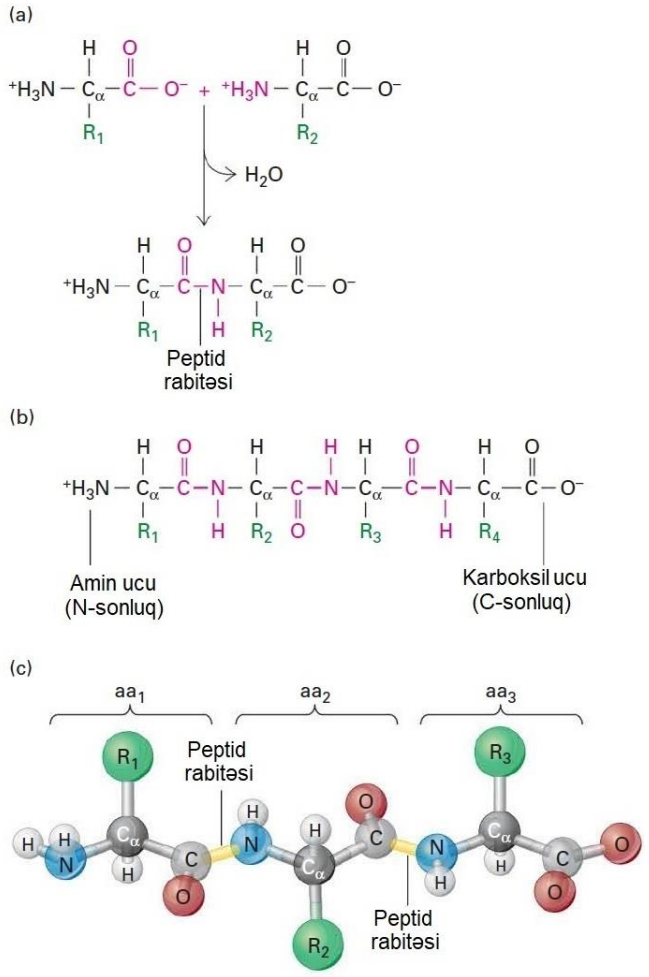


ŞƏKİL 3-2 Zülal ierarxiyasının dörd səviyyəsi. (a) Amin turşularının peptid əlaqələri ilə bir-birilə birləşmiş xətti ardıcıllığı zülalların birinci quruluşudur. (b) Polipeptid zəncirinin α-spiral və qatlanmış vərəqlər şəkilində β-quruluşda bükülməsi zülalın ikinci quruluşunu təsvir edir. (c) tək bir polipeptid zəncirində ikinci quruluş elementləri müxtəlif ilgəklər və dönmələrlə birlikdə daha böyük stabil quruluş şəkilində bükülür və bura müxtəlif domenlər daxil ola bilir, bu zülalın üçüncü quruluşudur. (d) Bəzi zülallar bir-biri ilə assosasiya əmələ gətirən birdən artıq sayda polipeptid zəncirlərindən təşkil olunub dördüncü quruluşu əmələ gtirirlər.

Zülalın **birinci quruluşu** onu təşkil edən amin turşu qalıqlarının kovalent rabitə ilə sadə xətti düzülüşü və ya ardıcıllığıdır. İlk dəfə birinci quruluşu təyin olunan zülal 1950-ci ildə insulin olmuşdur. Bu gün artıq onların sayı 10 milliondan çoxdur və hər gün bu getdikcə artır. Amin turşularının polimerləşməsindən əmələ gələn zənciri adlandırmaq üçün çox terminlər istifadə olunmuşdur. Amin turşularının peptid əlaqələri ilə əmələ gətirdiyi, və müəyyən olunan ardıcıllığa malik olan qısa zəncir **oliqopeptid** və ya sadəcə olaraq **peptid** adlanır, uzun zəncirlər **polipeptidlər** adlandırılır. Peptidlər əsasən 20-30 amin turşu qalığından az olan zəncirə deyildiyi halda polipeptidlər çox hallarda 300-500 amin turşu qalığı uzunluqda olurlar. Bu günə qədər öyrənilib təsvir olunmuş ən uzun zülal təxminən 34000 amin turşusu qalığından artıq olan əzələ zülalı titindir. Biz zülal (protein) sözünü əssən yaxşı təyin olunmuş üç-ölçülü quruluşa malik olan polipeptidləri və ya onların yaratdığı kompleksiləri adlandırırıq.

Zülalların və ya polipeptidlərin ölçüsü ya daltonla ifadə olunmuş kütlələri ilə verilir (dalton bir atomun kütlə vahidinə bərabərdir), ya da onların molekul çəkiləri (MÇ) kimi verilir, bundan alınan çəki qiyməti də daltona bərabərdir. Məsələn, 10000-MÇ olan zülal 10000 dalton (Da) və ya 10 kilodalton (kDa) kütləyə malikdir. Biz sonra bu fəsildə, zülalların ölçüsünü

və fiziki xüsusiyyətlərini müəyyən edən başqa metodlardan da istifadə edəcəyik. Hələ kovalent modifikasiya olunmamış zülalın dəqiq molekul çəkisi, onun aminturşu ardıcıllığından təyin edilmiş onu təşkil edən bütün amin turşularının çəkilərini tolamaqla asanlıqla hesablana bilər. Maya göbələyinin genləri ilə kodlaşdırılan zülallar orta hesabla 52728 malekul çəkiyə malikdir və təxminən 466 amin turşu qalığından təşkil olunub. Zülallarda amin turşularının orta molekul çəkiləri, onların orta təkrarlanmalarını nəzərə alaraq 113 götürülür. Bu rəqəmdən istifadə etməklə zülalın molekul çəkisini bilməklə onda olan amin turşusu qalıqlarının sayını tapmaq və ya əksinə, amin turşusu qalıqlarının sayını bilməklə zülalın təxmini çəkisini qiymətləndirmək olar. Zülalda bir və ya bir neçə amin turşusunun kovalent modifikasiyası – məsələn, fosforlaşma və ya qlikozilləşmə (bax Fəsil 2 və 13) – bu qalıqların kütləsini dəyişir, beləliklə zülalın da kütləsi dəyişilir.



ŞƏKİL 3-3 Polipeptidin quruluşu. (a) Fərdi amin turşuları peptid əlaqələri ilə birləşdirilir, birləşmə reaksiyası bir molekul suyun çıxması ilə müşayət olunur (dehidrasiya). R_1, R_2 və sair amin turşularının yan zəncirlərini tərənnüm edir ("R qruplar"). (b) Pptid əlaqələri ilə birləşmiş amin turşularının ***polipeptidlər*** adlandırılan xətti polimerləri sərbəst amin ucuna (N-sonluq) və sərbəst karboksil ucuna (C-sonluq) malikdirlər. (c) Kürə-və-çubuq modeli bir amin turşusunun (aa) amin qrupundakı azot atomu (mavi) və zəncirdə onun qonşuluğunda olan amin turşusunun karbonil qrupunun karbon atomu (boz) ilə əmələ gətirdiyi peptid əiaqələrini (sarı) göstərir. R qruplar (yaşıl) amin turşularında α karbon atomundan (qara) çıxaraq uzanır. Belə yan zəncirlər fərdi zülalların fərqli xüsusiyyətlərini əhəmiyyətli dərəcədə müəyyən edir.

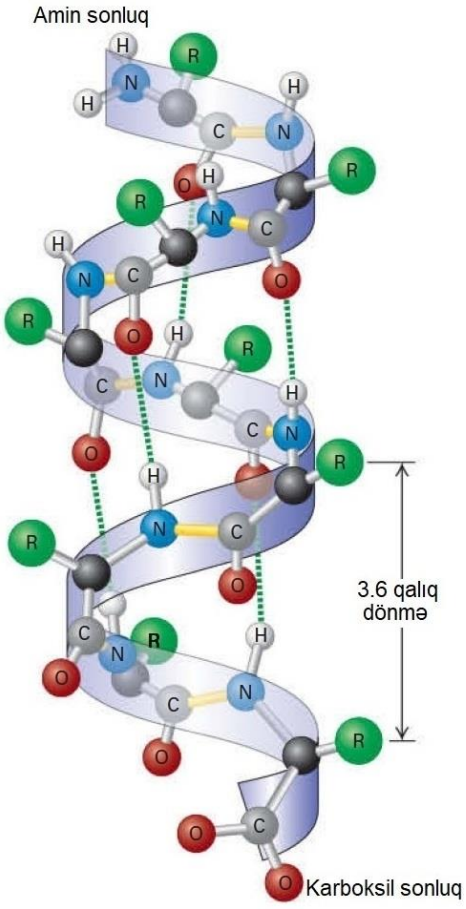
Tipik eukariot (nüvəli) hüceyrədə nə qədər zülal olur? Bu sayı bilmək üçün tipik eukariotik hüceyrəni, məsələn hepatositi (qaraciyər hüceyrəsini) götürək və hesablama aparaq. Bu hüceyrə təxminən kub şəkilli olub yanlardan 15 μm (0.0015 sm), həcmi isə 3.4×10^{-9} sm^3-dur (və ya millilitr, ml). Fərz edək ki, hüceyrənin sıxlığı 1.03 g/ml-dir, o zaman hüceyrə 3.5×10^{-9} q olacaq. Zülalların miqdarı təxminən hüceyrənin çəkisinin 20 faizini təşkil etdiyindən hüceyrə zülallarının ümumi çəkisi 7×10^{-10} q olacaq. Zülaların molekul çəkisi orta hesabla təxminən 52700 q/mol-dur, ona görə də biz hər bir qaraciyər hüceyrəsinə düşən zülalların molekul sayını hesablaya bilərik, bu ümumi zülal miqdarından və Avoqadro ədədinə görə istənilən kimyəvi birləşmədə bir molda olan molekulların sayından (6.02×10^{23}) hesablanaraq 7.9×10^{9} ətrafında olacaqdır. Bu hesablamanı aparmaq üçün daha bir addım ataraq, hesab edək ki, qara ciyər hüceyrəsi 10000 müxtəlif zülala malikdir, beləliklə hər bir hüceyrədə orta hesabla hər tip zülaldan milliona yaxın molekul olmalıdır. Faktiki olaraq müxtəlif zülalların zənginliyi, kifayət qədər seyrək olan insulin-birləşdirən reseptor zülalından (hər hüceyrədə 20000 molekul) çox böyük zənginliyə malik olan quruluş zülalı aktin zülalına qədər (hər hüceyrədə 5×10^{8} molekul) hüceyrədə çox dəyişir. Hər bir hüceyrə hər bir zülalın səviyyəsini o qədər sıx tənzimləyir ki, onların hər biri hüceyrənin funksiyası üçün kifayət qədər uyğun miqdarda təmsil olunsun. Biz zülalların səviyyəsini tənzimləmək üçün hüceyrənin istifadə etdiyi daha başqa mexanizmləri sonra, Fəsil 9 və 10-da öyrənəcəyik.

İkinci Qururluş Zülal Arxitekturasının Əsas (Core) elementləridir

Zülal quruluşunun ierarxiyasında ikinci səviyyə zülalların ikinci quruluşudur. İkinci quruluş polipeptid zəncirinin seqmentlərinin, zülal özülündəki karbonil və amid qrupları arasındakı hidrogen rabitələri hesabına və çox hallarda bu rabitələrin yaratdığı quruluş formalarının təkrarlanması hesabına verilmiş məkanda stabil düzülüşüdür. Polipeptid zəncirin seqmentinin verilmiş ikinci quruluşu əmələ gətirmək meyilliliyi onun aminturşu ardcllığından asılıdır (aşağıda 3.2 bölməsin. bax). Vahid bir polipeptid zəncirin aminturşu ardıcıllığından asılı olaraq zəncirin müxtəlif hissələri çoxsaylı ikinci quruluş tipinə malik ola bilir. Ən çox rast gəlinən, əsas ikinci quruluş tipləri **alfa (α) spiral**, **beta (β) vərəq** və **beta (β) dönmə**dir. Polipeptid zəncirirn bu formalarda bükülməyən, amma həmişə yaxşı təyin olunmuş və stabil hissəsi ***qeyri müntəzəm (requlyar) quruluş*** forması adlanır. ***Nizamsız (random) spiral*** termini polipeptid zəncilərin dəqiq üç-ölçülü quruluşa malik olmayan, dəyişkən hissələrinə aid edilir. Zülallarda polipeptid zəncirin orta hesabla 60 faizi α spiral və β vərəqlər şəkilində olur, molekulun qalan hissəsi spiral və dönmələrin yaratdığı qeyri müntəzəm quruluşdan ibarətdir. Beləliklə α spiral və β vərəqlər zülalların çoxunda quruluşun əsas daxili saxlayıcı elementləridir. Bu bölmədə, biz zülalların ikinci quruluşunun formalarını və onların əmələ gəlməsində iştirak edın qüvvələri öyrənirik. Sonrakı bölmədə, biz zülalların ikinci quruluş elementlərinin daha böyük və mürəkkəb quruluşda necə bükülməsini tədqiq edirik, buna da zülalların üçüncü quruluşu deyilir.

α spiral α spiral şəkilində bükülmüş polipeptid seqmentlərində özül spiral quruluşunu əmələ gətirir, hər bir peptid əlaqəsindəki karbonil qrupunun oksigen atomu hidrogen əlaqəsi ilə zəncir

boyu C-sonluq istiqamətində dörd qalıq aralıdakı amin turşusunun amid qrupunun hidrogeni ilə birləşir (Şəkil 3-4). α spiral daxilində özüldə olan başlanğıc və sonuncudan başqa bütün karboksil və amin qrupları bir-biri ilə hidogen əlaqələri vasitəsilə bağlanırlar. Əlaqələrin dövrü düzülüşü spiralda istiqamətin amindən-karboksil-sonluğa doğru olduğunu göstərir, çünki bütün hidrogen birləşdirən akseptorlar (karbonil qruplar) eyni orientasiyaya malikdirlər (Şəkil 3-4-də aşağıya-doğru istiqamətdə yönəlmiş), nəticədə spiral quruluşda hər 3.6 amin turşusu qalığı uzunluqda spiralın tam bir dövrəsi tamamlanır. Ona görə də, 36 qalıqdan ibarət olan α spiralda tam 10 dönmə (dövrə) vardır və onun uzunluğu 5.4 nm-dir (0.54 nm/dövür spiral uzanması).



ŞƏKIL 3-4 α spiral, zülallarda ümumi ikinci quruluşdur. Polipeptid özül (zolaqda görünür), özüldəki hidrogen və oksigen atomları arasında olan hidrogen rabitələri ilə qurulub saxlanan spiralda bükülür. Yalnız hidrogen əlaqələrinə girən hidrogen atomları göstərilmişdir. Spiralın xarici səthi yan zəncir R qurupları ilə (yaşıl) örtülmüşdür.

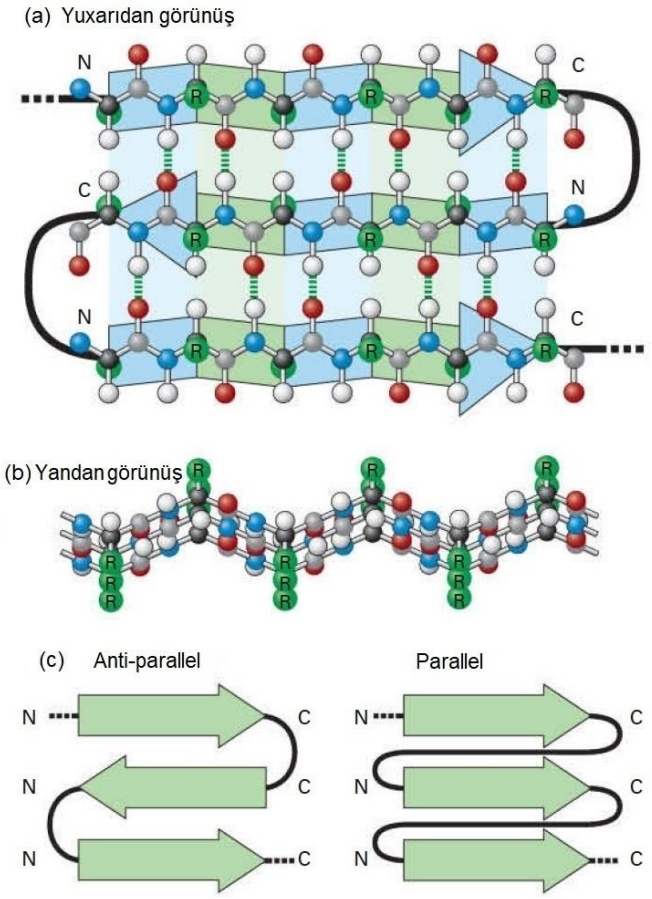
Hdrogen əlaqələri ilə birləşmiş amin turşularının α spiralda stabil düzülüşü, polipeptid özülü düz, çubuqşəkilli silindir formasında saxlayır və yan zəncirlər silindirdən yanlara doğru kənara yönəlir. Zülal molekulu daxilində verilmiş spiralın nisbi hidrofobluq və ya hidrofillik keyfiyyəti yan zəncirlərin xüsusiyyətləri ilə müəyyən olunur. Suda həll olan zülallarda, hidrofil spirallar xarici səthdə yerləşməyə meyillidirlər, burada onlar xarici su (akvatik) mühiti ilə qarşılıqlı əlaqə yaradırlar, amma hidrofob spirallar bükülmüş zülalın əsasən daxili hissələrində batmağa meyillidirlər. Hüceyrə membranının hidrofob özəyinə yüklənmiş zülallar (bax Fəsil 7) membranı kəsib keçmək üçün çox zaman bir və ya daha artıq 20-25 qalıq uzunluqda hidrofob spiraldan istifadə edir. Adətən prolin amin turşusu α spiralda tapılmır, çünki prolində yan zəncirin karbonu ilə kovalent birləşmiş amin qrupu onun normal hidrogen əlaqələrinə girərək stabil spiralın yaranmasında iştirak etməyinə mane olur. Klassik α spiral, zülalların daha möhkəm daxili stabilliyə malik olan və daha geniş yayılmış spiral forması olduğundan, onun daha sıx burulan və ya nisbətən boş burulan formalar kimi variasıyaları mövcuddur. Məsələn, spirallaşmış-spiral adlanan xüsusi spiral forması (növbəti bir neçə bölmədə təsvir olunur), spiralda daha sıx burulur (3.5 qalıq və 5.1 nm).

β vərəqlər İkinci quruluşun başqa bir tipi, β vərəqlər yanı üstə (laterally) bükülmüş β zəncirdən təşkil olunub. Hər bir β zəncir qısa (5-8 qalıqdan ibarət), demək olar ki, tam dartılmiş polipeptid seqmentdən ibarətdir. Özuldə yaxın qalıqlar arasında amin və karboksil qrupları arasındakı hidrogen əlaqələrinin əmələ gəldiyi α spiraldan fərqli olaraq β vərəqlərdə hidrogen rabitələri ayrı-ayrı, amma bir-birinə yaxın yerləşən, qonşu olan β zəncirdəki özül atomları arasında əmələ gəlir, həmçinin hidrogen rabitələri zəncirin özül atomlarına perpendikulyar istiqamətlənmiş olur (Şəkil 3-5a). Bu, fərqli β zəncirlər, ya β zəncir seqmentləri arasında uzun və ya qısa ilgəklərin olduğu eyni polipeptid zənciri daxilində olur, ya da müxtəlifi polipeptidlərdən təşkil olunmuş zülallarda ayrı-ayrı polipeptid zəncirlərdə olur. Şəkil 3-5b iki və ya daha artıq β zəncirin, yaxın qonşu sıralarda necə düzülərək bükülmüş (qat-qat) ikiölçülü β vərəqlər (və ya sadəcə olaraq *qat-qat vərəq*) əmələ gətirirmələri göstərilir, bunlarda hidrogen əlaqələri vərəqlərin müstəvisində β zəncirləri bir yerdə saxlayır, yan zəncirlər isə müstəvinin alt və üst hissələrindən çıxmış vəziyyətdə olurlar. α spiralda olduğu kimi, β vərəqlər də peptid əlaqələrinin orientasiyası ilə müəyyən olunan istiqamətlənməyə malikdir. Ona görə də, qatlanmış vərəqdə, yaxınlıqdakı β zəncirlər bir-birinə nisbətən ya eyni istiqamətdə (paralel) (bax Şəkil 3-5a), ya da alternativ əks istiqamətdə (antiparallel) (Şəkil 3-5c) yerləşə (yönələ) bilirlər.

Bəzi zülallarda, β vərəqlər zülalın hidrofob özəyinin bir hissəsini (aşağıda müzakirə olunur) və ya başqa molekulların birləşdiyi açıq sahənin yan tərəfini əmələ gətirirlər; membrana batmış bəzi zülallarda β vərəqlər burulub əyilərək mərkəzi hidrofob deşiyi yaradır, buradan da ionlar və kiçik molekullar keçib gedə bilirlər (bax Fəsil 7).

β dönmələr Dörd qalıqdan təşkil olunan β dönmələr zülalın səthində yerləşir, sərt əyilmələri yaradaraq polipeptid özülün istiqamətini, çox hallarda zülalın daxilinə tərəf dəyişir. Bu qısa, U-ya bənzər formada olan ikinci quruluşlar, əksər hallarda onların sonluğunda olan qalıqlar arasındakı hidrogen rabitələri ilə stabilləşir (Şəkil 3-6). Dönmələrdə adətən qlisin və prolin durur. Qlisində yan zəncirin olmaması və prolində yaranmış- daxili əyilmənin olması polipeptid özülünə imkan verir ki, bükülərək möhkəm U-formasını əmələ gətirsin. β dönmələr, böyük zülallara yüksək dərəcədə kompakt quruluşda bükülməyə imkan verir. Dəqiq müəyyəm olunmuş altı tip dönmələr var, onların dəqiq quruluşu H-rabitəli qarşılıqlı əlaqələrin yerləşməsindən asılıdır. Polipeptid özül də həmçinin

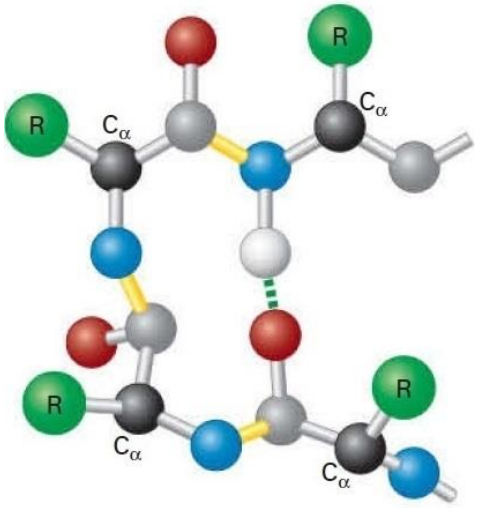
daha uzun ilgəklərə və əyilmələrə malik ola bilir. Yalnız bir neçə dəqiq-müəyyən olunmuş konformasiyalarda rast gəlinən sıx β dönmələrin əksinə olaraq, daha uzun ilgəklər çox müxtəlif konformasiyalara malik ola bilirlər.



ŞƏKİL 3-5 β vərəqlər, zülalların başqa ümumi ikinci quruluş formasıdır. (a) Yuaxrıdakı görünüş anti parallel β zəncirlərdən təşkil olunmuş sadə üç-zəncirli β vərəqdir. Hər bir zəncir növbələşən yaşl və mavi seqmentləri olan, N-dən C-yə doğru istiqamələnmiş lent-şəkilli oxlarla işarələnmişdir, birləşdirici qalıqların ilgəkləri qalın qara xətlərlə gstərilir. Bu antiarallel β vərəqlərdə hər bir zəncir (ox) yaxındakı bitişik zəncirin əksi istiqamətində ynəlmişdir. β zəncirlər arasndakı stabilləşdirici hidrogem əlaqələri yaşıl qırıq xətlərlə göstərilmişdir. (b) Antiparallel β vərəqin yan görünüşü. Vərəqlərin alt və üst hissələrində R qrupların uzanması (yaşıl) bu görünüşdə aydın görünür. Polipeptid özüldə rabitələrin təyin olunmuş bucağı növbələşən rəngli seqmentlərin (a) panelində verilmiş qat-qat konturunu əmələ gətirir. (c) β vərəqin yuxarıdan görünüşü, fərdi zəncirlər (N-dən-C-yə istiqamət oxlarla gstərilir) ya antiparalleldirlər, zəncirlər əks istiqamətdə ynəlmişlər (solda), ya da paralleldirlər, eyni istiqamətdə ynəlmişlər (sağa).

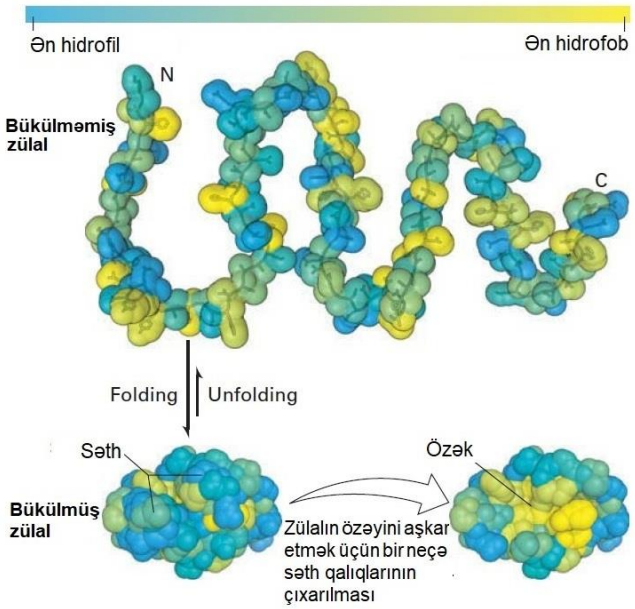
Üçüncü Quruluş Polipeptid Zəncirin Ümumi Bükülməsidir

Üçüncü quruluş, polipeptid zəncirin tərkibinə daxil olan bütün aminturşu qalıqlarının düzülüşünün üç-ölçülü təşkili olub zülalların geniş yayılmış ümumi quruluş forması hsab edilir. Yalnız hidrogen əlaqələri ilə stabilləşən ikinci quruluşun əksinə olaraq, üçüncü quruluş, polyar yan zəncirlər və özülün amin və karboksil qrupları arasındakı hidrogen əlaqələri ilə birlikdə, əsasən qeyri polyar yan zəncirlər arasındakı hidrofob qarşılıqlı əlaqələrlə stabilləşirlər. Bu stabilləşdirici qüvvələr, ikinci quruluşun elementlərini - α spiralları, β zəncirləri, dönmələri, ilgək və spiralları bir yerdə saxlayır. Amma, çox hallarda stabilləşdirici qarşılıqlı əlaqələr zəif olduğundan, zülalların üçüncü quruluşu möhkəm şəkildə qurulmamışdır, fasiləsiz şəkildə qısa-müddətli dəyişilmələrə uğrayır və üçüncü quruluş daxilində zülalın bəzi seqmentləri elə dəyişkən ola bilir ki, onlar quruluşun pozulması kimi hesab edilir, bu zaman, dəqiq-müəyyən olunmuş, stabil üç-ölçülü quruluş itirilmiş olur. Zülalın quruluşundakı dəyişmələr onun funksiyasının tənzimlənməsi üçün böyük əhəmiyyət kəsb edir.



ŞƏKİL 3-6 β dönmənin quruluşu. Dörd qalıqdan təşkil olunmuş β dönmələr polipeptid zəncirin istiqamətini dəyişir (180° U dönmə). Birinci və dördüncü qalıqların C_α karbonları adətən bir-birindən 0.7nm az məsafədədir, və bu qalıqlar adətən (çox vaxt) hidrogen əlaqələri ilə birləşirlər. β dönmələr, uzun polipeptidlərin kompakt quruluşda bükülməsinə imkan yaradır.

Amin turşuları yan zəncirlərinin kimyəvi xassələri üçüncü quruluşun təyinininə kömək edir. Məsələn, hüceyrədən kənara ifraz olunanlar və ya hüceyrəxarici mühitə baxan hüceyrə səth reseptorları kimi bəzi zülallarda sistein qalıqlarının yan zəncirləri arasındakı ***disulfid əlaqləri*** zülalın müxtəlif nahiyələrini kovalent rabitə ilə birləşdirir, nəticədə zülalın üçüncü quruluşunun dəyişilmələrini azaldaraq onun stabilliyini artırır. Hidrofil polyar yan zəncirə malik olan amin turşuları zülalın xarici səth tərəfində olmağa meyillidirlər; su ilə qarşılıqlı əlaqədə olaraq, onlar zülalın sulu mühütdə həll olan vəziyyətdə olmasına kömək edirlər və başqa suda həll olan maddələrlə, o cümlədən başqa zülallarla qeyri kovalent əlaqələr yaradırlar. Bunların əksinə, adətən su-mühiti ilə rastlaşmaqdan qaçan zülalların qeyri polyar hidrofob yan zəncirə malik olan amin turşuları çox hallarda suda-həll olmayan mərkəzi özəyi əmələ gətirirlər. Bu müşahidələr, zülalın müqayisəli dərəcədə hidrofobluğuna və ya "yağa" bənzər özəyə malik olmasına görə zülal konformasiyasının "yağ damcıları modeli"nin yaranmasına gətirib çıxarır (Şəkil 3-7). Yüksüz hidrofil polyar yan zəncirlər zülalın həm səthində həm də daxili özək hissəsində tapılmışdır.



ŞƏKİL 3-7 Zülal bükülməsinin yağ damcıları modeli. Polipeptid zəncirin hidrofob və hidrofil qalıqları, təsvir edildiyi kimi, bükülməmiş zülalda xətti ardcıllıq üzrə paylana bilir (yuxarıda). Rənglər ən çox hidrofil olan qalıqları (mavi) və ən çox hidrofob qalıqları (sarı) gstərir. Zülal büküləndə (aşağıda solda) hidrofil (yüklü və yüksüz polyar) yan zəncirlər çox zaman zülalın səthində qalır və burada onlar ətraf mühitin suyu və ionları ilə stabilləşdirici qarşılıqlı əlaqə yarada bilirlər. Əksinə zəncirin hidrofob qalıqları birlikdə daxili özəkdə klaster əmələ gətirməyə meyillidirlər, necə ki, suya düşmüş yağ damcıları kimi hidrofob təsir ilə su mühitindən kənara çəkilirlər (bax Fəsil 2). Bu özək qalıqlar bir neçə səth qalqları çıxarıldıqdan sonra daha asanlıqla grünürlər (aşağıda sağda). [Verilənlər M. C. Vaney et al., 1996, *Acta Crystallogr., Sect. D*. **52**:505, PDB ID 193l-dən.]

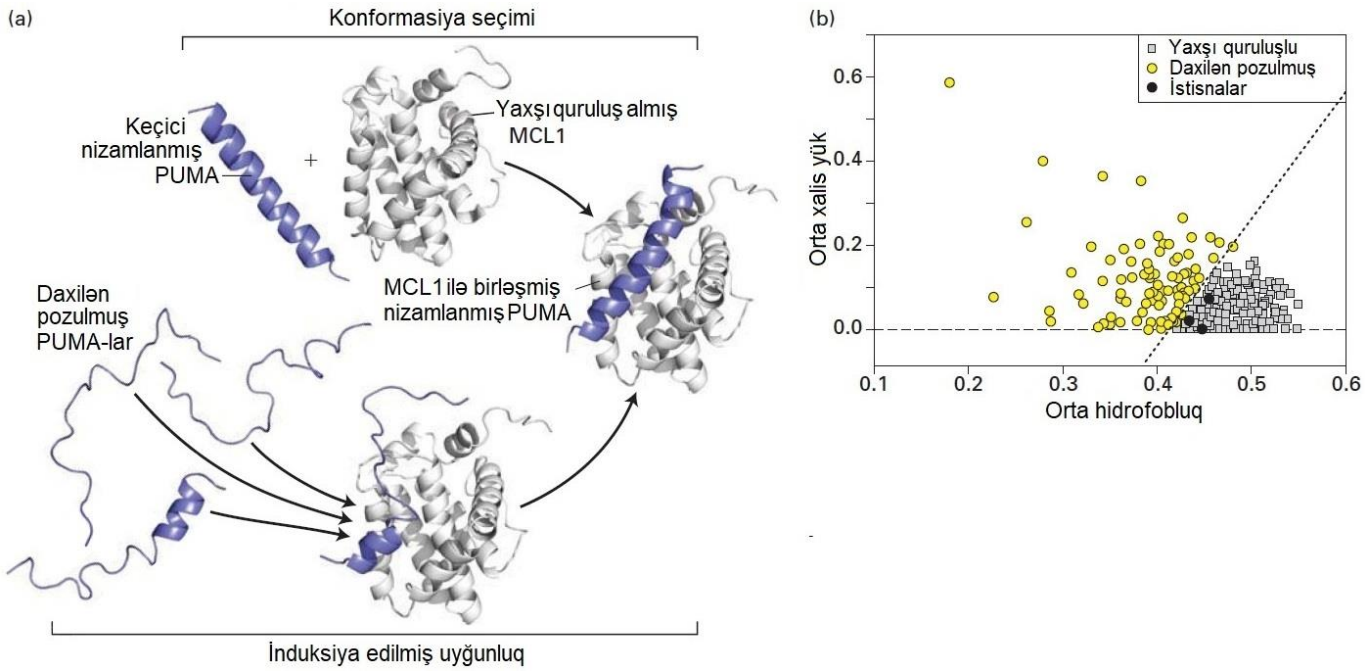
Zülalların Geniş Yayılmış Dörd Quruluş Kateqoriyas Var

Zülallar, adətən onların üçüncü quruluşlarına görə geniş yayılmış dörd quruluş kateqoriyalarından birinə düşürlər: *qlobulyar zülallar*, *fibrilyar zülallar*, *inteqral membran zülalları* və *daxilən nizamsəz zülallar*. Zülalların bu geniş yayılmış dörd kateqoriyası qarşılqlı istisna təşkil etmirlər, bəzi zülallar iki və ya daha artıq kateqoriyaya aid olan seqmentlərdən təşkil olunublar. ***Qlobulyar zülallar*** adətən suda-həll olan olub, kompakt bükülmüş qurulyşa malikdirlər, çox hallarda, amma müstəsna hal kimi yox, kürəşəkilli (sferik) olurlar və ikinci quruluşun müxtəlif formalarını özündə cəmləyirlər [ras zülalının (Şəkil 3-9 aşağıda) və myoqlobulinin (Şəkil 3-14 aşağda) quruluşuna bax]. ***Fibrilyar zülallar***, böyük, çox uzun, çox hallrda sərt formalı molekullardir. Bəzi fibrilyar zülallar çox uzun polipeptid zəncirdən təşkil olunub, qısa amin turşusu ardıcıllıqlarının tək bir ikinci quruluşu əmələ gətirən (Şəkil 2-25-də heyvanlarda çox geniş yayılmış kollagen zülalının qurulyşuna bax) təkrarlanan tandem nüxsələrinə malik olurlar. Başqa fibrilyar zülallar, qlobulyar zülal subvahidlərinin təkrarından təşkil olunur, məsələn F-aktin mikrofilamentlərini əmələ gətirən G-aktin zülalının monomerlərinin spiral quruluşu (bax Fəsil 17). Çox hallarda multizülal liflərə aqreqasiya olunan suda həll olmayan fibrilyar zülallar, adətən ya hüceyrənin quruluşunun təşkilində rol oynayır ya da hüceyrənin hərtəkətində iştirak edir. ***İnteqral membran zülalları,*** hüceyrəni və ya orqanoidləri əhatə edən membranın ikiqat fosfolipid qatlarına keçirilmiş olurlar və Fəsil 7-də ətraflı müzakirə olunurlar.

Daxilən nizamsız zülallar başqa üç kateqoriyanın yaxşı-nizamlanmış zülallarından fundamental şəkildə fərqlənirlər. Bu kitabda baxdığımız çox zülallar təbii normal funksional vəziyyətdə bir və ya bir neçə bir-birinə çox yaxn olan konformasiyanı alırlar, buna *nativ vəziyyət* deyilir. Amma, daxilən nizamsız zülallar öz nativ, funksional vəziyyətində yaxşı-nizamlanmış quruluşa malik deyillər, əvəzində onların polipeptid zənciri çox dəyişkəndir, həqiqətən nizamsızdır, dəqiq sabit konformasiyaya malik deyil. Bəzən bütün zəncirdə deyil, polipeptid zəncirin yalnız bir seqmenti daxilində nizamsəz olurlar. Daxilən nizamsız zülalların və ya zülal seqmentlərinin müstəsna (qeyri adi) konformasiya dəyişkənliyi onların funksional fəaliyyəti, çoxsaylı partnyor zülallarla əlaqə yaratmaq, və ya belə partnyorlarla birləşdikdən sonra yaxşı-nizamlanmış zülallara bükülməsi (Şəkil 3-8a) üçün çox mühümdür.

Daxilən nizamsız zülallar həmişə deyil, amma çox zaman siqnal molekulu, başqa molekulların tənzimləyiciləri rolunu, və ya bir-çox zülallar, kiçik molekullar və ionlar (məsələn, çoxsayl yüklü qalqlarla ionların birlşməsi) üçün Skafold rolunu oynayırlar. Daxili nizamsız rayonlar zülaln yaxşı-nizamlanmış rayonları arasında dəyişkən linkləri və ya sərhədləri təmin edirlər; zülalların bəzi tip post-translyasiya modifikasiyaları üçün sayt rolunu oynayırlar [məsələn, fosfat qruplarının kovalent əlavə edilməsi (fosforlaşma, və ya şəkərlərin əlavə edilməsi (qlikozilləşmə)]; zülalların fəallığını tənzimləyən proteaza ilə kəsilmə üçün hədəf rolunu oynayırlar; onlar öz yerləşdikləri zülalın fəallığını ingibirləşdirirlər (avtoingibirləşmə saytı); zülalların hüceyrədaxili çeşidlənəsində siqnal molekulu rolunu oynayırlar (bax Fəsil 13). Daxilən nizamsız seqmentlərə malik olan çox zülalların fəaliyyəti növbəti fəsillərdə təsvir edilir. Məsələn, RNT polimeraza II-də tərkibində prolin, treonin, və serin qalıqları olan yeddi-aminturşu-ardıcıllığının çoxsaylı təkrarlarından ibarət olan nizamsız C-sonluq domenin (CTD) fosforlaşması (bax Şəkil 8-12) mRNT-nin sintezinin əsas mərhələsini tənzimləyir (bax Fəsil 9 və 10). DNT-nin xromatində təşkilinə nəzarət edən histon zülallarının (bax Fəsil 8) N-sonluğu post translyasiya modifikasiyasının çox əhəmiyyətli saytıdır və nizamsızdır, formin zülalının prolinlə zəngin FH1 rayonu aktin filamentlərin toplanmasını nizamlayır (bax Fəsil 17).

Daxilən nizamsız zülallar proteaza ilə kəsilməyə həssaslq testi kimi (nizamsız rayonlar adətən proteazalara yüksək həssaslq göstərirlər) müxtəlif biokimyəvi metodlardan və geniş müxtəliflikdə biofiziki metodlardan, o cümlədən spektroskopiyadan istifadə edərək eksperimental yolla identifikasiya oluna bilərlər. Görünür ki, bu zülalların daxili nizamsızlığı, onların yaxşı nizamlanmış zülallara nisbətən prolin amin turşusu ilə zəngin olmaları və xalis yüklü ardıcıllığa və çox az hidrofob qalqlara malik olmaları nəricəsində yaranır (Şəkil 3-8b). Amin turşusu tərkibinin, xüsusən də xalis yükün və hidrofobluğun hesablanmasına əsaslanan alqoritm hansı zülalların və ya zülalların seqmentlərinin daxilən nizamsız olmasını proqnozlaşdırmağa imkan verir. Bəzi təxminlərə görə, ehtimal olunur ki, eukariot zülallarının 30 faizə qədərinin və ya daha çoxunun ardıcıl 50 və daha artıq qalıqdan ibarət olan ən azı bir seqmenti nizamsızdır.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 3-8 Daxilən nizamsız zülallar: yaxşı-nizamlanmış zülallara birləşmə və hidrofobluğa və xalis yükə əsaslanan identifikasiya mexanizmləri. (a) Daxilən nizamsız zülalların (PUMA, mavi) yaxşı nizamlanmış zülallara (MCL1, boz) birləşməsi əvvəlki nizamsız zülalda nizamlı quruluşun yaranması ilə nəticələnir. PUMA və MCL1 hüceyrədaxili zülallardırlar və hüceyrə ölümünün apoptoz adlanan tənzimlənən proseslərinə təsir edə bilirlər (bax Fəsil 21). Hər iki zülalın quruluş əmələ gətirən birləşmiş kompleksinin yaranmasında iki mexanizmin mövcud olması guman edilir: konformasiya seçimi (yuxarıdakı yol) və induksiya olunan uyğunluq (aşağıdakı yol). Konformasiya seçimində, nizamsız zülal (PUMA) hərdən-bir və keçici olaraq məhlulda birləşmiş halda ola biləcəyi quruluşu alır. Yaxşı nizamlanmış birləşmı partnyoru (MCL1) daha sonra müvəqqəti, nizamlı konformasiyada PUMA (seçim) ilə birləşə və nisbətən sabit birləşmiş kompleksi əmələ gətirə bilir. İnduksiyaya olunan uyğunlaşmada, nizamsız zülal yaxşı nizamlanmış partnyor zülalla birləşməyə başlayır, hələ də nizamsız olduğu halda, o birləşdikdən sonra nisbətən stabil heterodimer kompleksdə mövcud olan nizamlı konformasiyanı əmələ gətirmək üçün induksiya olunur. Son zamanların eksperimentləri göstərir ki, induksiya olunan uyğunlaşma mexanizmi PUMA-nın MCL1-ə birləşməsini çox yaxşı təsvir edir. (b) 275 yaxşı nizamlanmış, monomer qlobulyar zülallar (boz kvadratlar) və 91 daxilən nizamsız zülallar (qara və sarı dairələr), hər bir zülalda qalıqlara görə ortalama hidrofobluğu (*x* oxu) 0-dan (ən az hidrofobluq) 1-ə (ən yüksək hidrofobluq) qədər şkalada və pH 7-də orta xalis yükü (*y* oxu) hesablamaq üçün istifadə edilmişlər. Yalnız üç istisna ilə (qara dairələr) zülallar iki fərqli paylanmanı müəyyən edir: yüksək xalis yüklü (daxilən nizamsız, sarı dairələr) aşağı hidrofobluq və aşağı xalis yüklü (yaxşı nizamlanmış, boz kvadratlar) yüksək hidrofobluq. Yaxşı nizamlanmış populyasiya ilə üst-üstə düşən üç nizamsız zülalın (qara dairələr) hər biri nizamsız olduğu hesab edilən seqmentlərə (aşağı hidrofobluq, yüksək xalis yük) malikdir və gürünür ki, əks halda yaxşı nizamlanmış konformasiya ilə nəticələnə bilən zülalın qalan bütün hissəsinin ardıcıllığını pozur. [(a) hissə Rogers, J. et al., "Folding and Binding of an Intrinsically Disordered Protein: Fast, but Not 'Diffusion-Limited,'" *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135 (4), pp1415-1422. http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja309527h - dən. (b) hissə verilənləri V. N. Uversky, J. R. Gillespie, and A. L. Fink, 2000, *Proteins* **41**:415–427 – dən.]

Zülalların Konformasiyasını Təsvir Etməyin Fərqli Yolları Fərqli İnformasiya Tiplərini Verir

Zülalların üç-ölçülü quruluşunu təsvir etməyin ən sadə yolu özül atomlarının istiqamətini, bəzi hallarda yalnız qalın xətlə göstərilən C_α atomunu izləməkdir (C_α özülün izi, Şəkil 3-9a); şar-və-çubuq modeli adlanan daha mürəkkəb model isə hər bir atomu göstərir (Şəkil 3-9b). C_α özülün izlənməsi polipeptid zəncirinin ümumi bükülməsini, amin turşularının yan zəncirlərini nəzərə almadan göstərir; sonrakı, şar-və-çubuq modeli (şarlar atomları göstərir, çübüqlar isə rabitələri göstərir) isə yan zəncir atomlarının qarşılıqlı əalqələrinin detallarını, o cümlədən zülalın konformasiyasını stabilləşdirən atomların əlaqələrini, həmçinin başqa molekullarla və eləcə də özül atomları ilə olan qarşılıqlı əlaqələrin detallarını göstərir. Hərçənd ki, hər iki görünüş faydalıdır, amma, onlarda ikinci quruluşun elementləri həmişə asanlıqla görünümür. Başqa tip təsvirdə, ikinci quruluşu göstərmək üçün ümumi qısa simbollardan istifadə olunur, məsələn, α spiral üçün spiral şəkilli lentlər və ya qalın silindirlər, β zəncirlər üçün yastı lentlər və ya oxlar, β dönməlr, spiral və ilgəklər üçün dəyişkən nazik zəncirlərdən istifadə olunur (Şəkil 3-9c). Əsas lent diaqramının variasiyası, şar-və-çubuq və ya fəza-doldurulmuş modellərdə yan zəncirlərin hamısı və ya müəyyən hissəsi özül lentinə birləşdirilə bilir. Bu metodda, maraq dairəsində olan yan zəncirlər ikinci quruluşun konteksində vizuallaşdırıla bilər, bu lent şəkilli modeldə xüsusilə aydın şəkildə təmsil olunmuşdur.

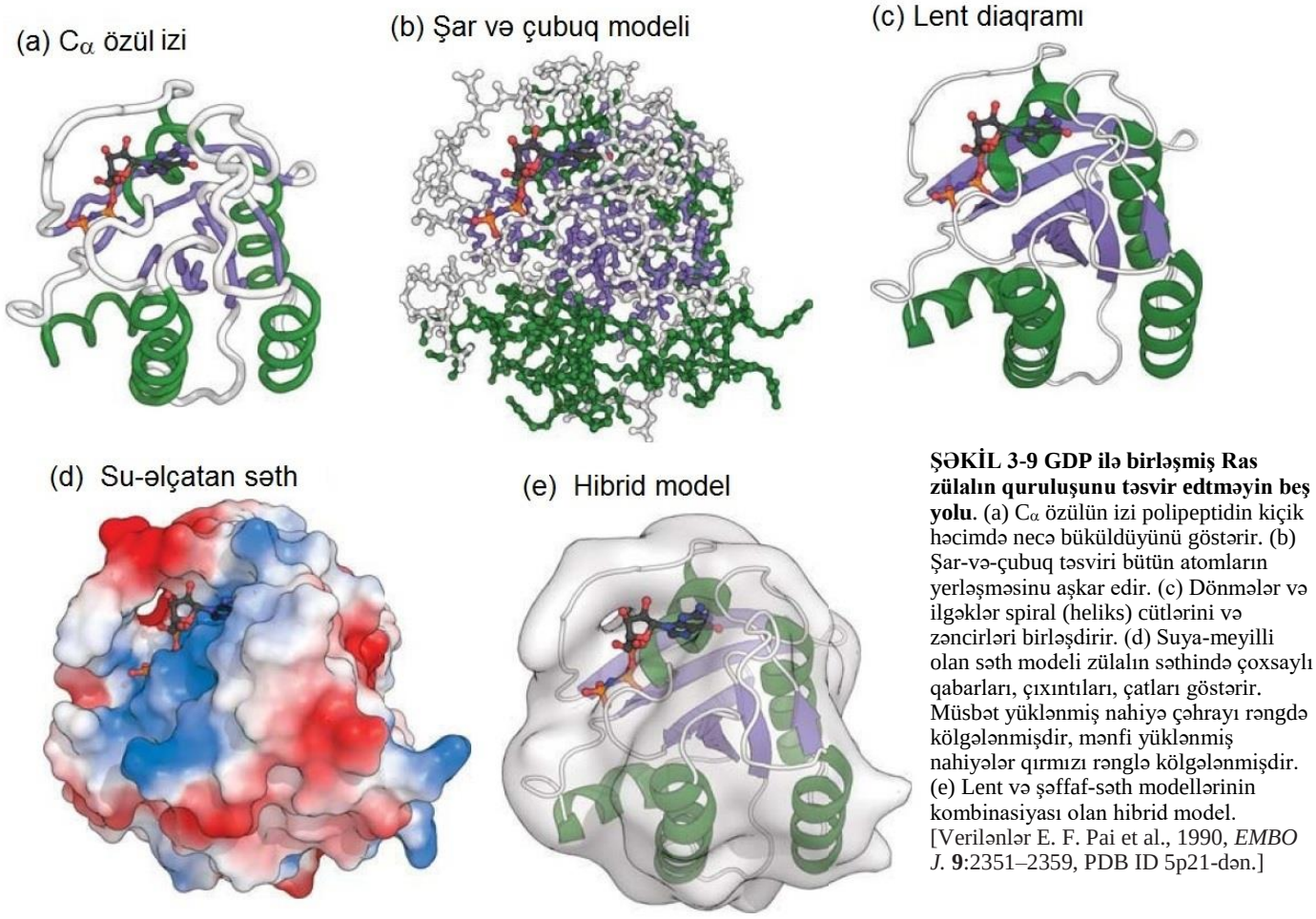
Amma, zülalların quruluşunu təqdim edən bü üç yoldan heç biri, zülalın səthində olan və su mühiti ilə əlaqədə olan atomlar barədə kifayət qədər məlumatı vermir. Səth ona görə maraqlıdır ki, başqa molekullar zülala məhz burada birləşirlər. Beləliklə, zülalları təsvir edən alternativ yol yalnız su ilə əlaqədə ola bilən səthi göstərmək, hidrofobluq və ya hidrofillik kimi ümumi kimyəvi xarakterə malik olan rayonları işıqlandıran

rəngləri istifadə etmək, həmçinin müsbət (əsas) və mənfi (turşu) yan zəncirlər kimi yük xarakteriskasından istifadə etməkdir (Şıkil 3-9d). Belə modellər zülal səthinin topoqrafiyasını və yüklərin paylanmasını, həm birləşmə saytının mühüm xüsusiyyətlərini, həm də kiçik molekullar birləşərkən səthdə əmələ gələn kiçik çatları aşkar edir. Bu görünüş, zülalın başqa molekul tərəfindən necə "göründüyünü" təsvir edir.

Quruluş Motifləri İkinci Quruluşun Müntəzəm Kombinasiyasıdır

Fərqli üç-ölçülü quruluşu əmələ gətirən iki və daha artıq ikinci quruluş formalarının xüsusi kombinasiyası, müxtəlif zülallarda ortaya çıxırsa bu **quruluş motifi** adlanır. Quruluş motifi adətən, amma həmişə yox, xüsusi funksiya ilə bağlı olur. İstənilən xüsusi quruluş motifi, tez-tez hallarda müxtılif zülallarda kalsium kimi xüsusi ionlara və ya ATP kimi kiçik molekullara birləşmə kimi ümumi funksiyanı həyata keçirir. Biz tezliklə görəcəyik ki, bəzi quruluş motifləri zülalın qalan hissəsindən ayrıldıqda stabil qalır, ona görə də quruluş domeni adlanırlar. Amma başqa quruluş motifləri zülalın başqa hissələri olmadan termodinamiki cəhətdən stabil quruluş deyillər, ona görə də sərbəst quruluş domeni hesab edilmirlər.

Ümumi quruluş motiflərindən biri α spiral-əsaslı **spirallaşmış spiral (coiled coil)**, və ya heptad təkrardır. Çox zülallar, o cümlədən fibrilyar zülallar və transkripsiya faktorları adlandırılan DNT-tənzimləyici zülallar (bax Fəsil 9), spirallaşmış-spiral motifindən istifadə edərək dimerlər və ya trimerlər şəkilində yığılırlar, iki, üç, hətta dörd ayrıca polipeptid zəncirlərdən ibarət olan α spirallar bir-birinə burulur - nəticədə spiralların spiralını yaradırlar, buradan da onların adı meydana gəlmişdir (Şəkil 3-10a). Fərdi spirallar bir-biri ilə sıx şəkildə birləşir, çünki hər bir spiral, spiralın bir tərəfindən çıxaraq uzanan, açıq alfatik (hidrofob, amma qeyri aromatk) yan zəncirlərin (leysin, valin və sair) zolağına malikdir və ona yapışan başqa spiraldan şıxmış oxşar yan zəncirlərlə qarşılıqlı əlaqə yaradaraq hidrofob qrupu sudan uzaq saxlayır və çoxsaylı sərbəst spiralların toplanmasını stabilləşdirir. Hidrofob zolaqlar spiralın yalnız bir tərəfi boyu yaranır, çünki hər bir spiralın ilkin (birinci) quruluşu yeddi-amin-turşusu vahidlərinin heptadlar adlanan təkrarlarından təşkil olunmuşdur, birinci və dördüncü qalıqların yan zəncirləri alfatikdir və başqa yan zəncirlər çox hallarda hidrofil olurlar (Şəkil 3-10a). Hidrofil yan zəncirlər spiralın bir tərəfindən və hidrofob yan zəncirlər isə başqa bir, əks tərəfindən uzandığından ümumi spiral quruluş **amfipatik** olur. Leysin adətən həmişə dördüncü vəziyyətlərdə yerləşdiyindən hidrofob yan zəncirlər cilitkənin dişləri kimi birləşir, ona görə də bu quruluş motifləri **leysin-cilitkələr (leucine zippers)** adlandırılır.

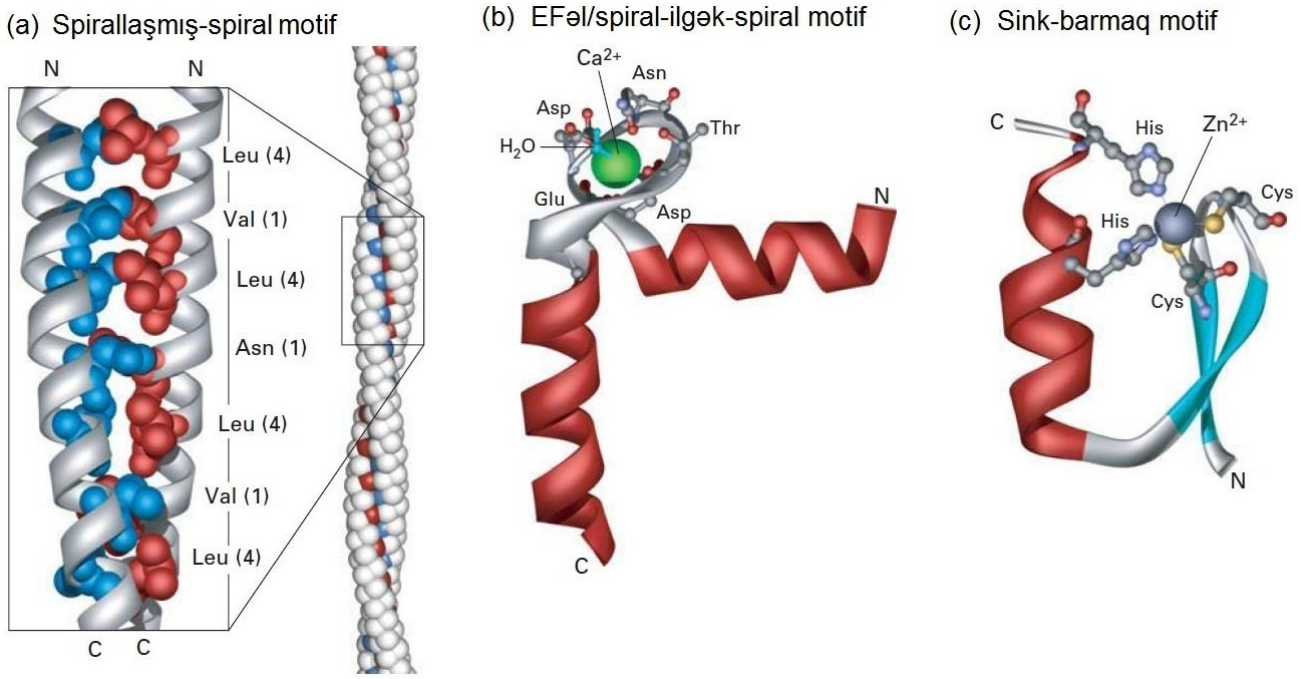


ŞƏKİL 3-9 GDP ilə birləşmiş Ras zülalın quruluşunu təsvir edtməyin beş yolu. (a) Cα özülün izi polipeptidin kiçik həcimdə necə büküldüyünü göstərir. (b) Şar-və-çubuq təsviri bütün atomların yerləşməsinu aşkar edir. (c) Dönmələr və ilgəklər spiral (heliks) cütlərini və zəncirləri birləşdirir. (d) Suya-meyilli olan səth modeli zülalın səthində çoxsaylı qabarları, çıxıntıları, çatları göstərir. Müsbət yüklənmiş nahiyə çəhrayı rəngdə kölgələnmişdir, mənfi yüklənmiş nahiyələr qırmızı rənglə kölgələnmişdir. (e) Lent və şəffaf-səth modellərinin kombinasiyası olan hibrid model. [Verilənlər E. F. Pai et al., 1990, *EMBO J.* **9**:2351–2359, PDB ID 5p21-dən.]

Çox sayda başqa motiflər α spirala malikdirlər. **EF-əl** adlandırılan kalsium-birləşdirən ümumi motif ilgəklərlə bağlanmış iki qısa spiraldan ibarətdir (Şəkil 3-10b). Bu quruluş motifi bir sıra spiral-dönmə-spiral və spiral-ilgək-spiral quruluş motiflərindən biri olub 100-dən artıq zülalada tapılmışdır və hüceyrədə hüceyrədaxili kalsiumun səviyyəsini hss etmək üçün istifadə olunur. İlgəkdə konservativ qalıqlarda oksigen atomlarına Ca^{2+} ionlarının birləşməsi Ca^{2+} ionlarının qatılığından asılıdır və çox hallarda zülalda konformasiya dəyişikliyini induksiya edərək onun fəallığını dəyişir. Beləliklə kalsiumun qatılığı birbaşa zülalın quruluşunu və onun funksiyasını tənzimləyir. Müəyyən dərəcədə, başqa spiral-dönmə-spiral və **əsas spiral-ilgək-spiral** (bHLH) quruluş motifləri zülalın DNT-yə birləşməsində və uyğun olaraq gen fəallığının tənzimlənməsində istifadə olunurlar (bax Fəsil 9). Daha başqa quruluş motifi, DNT və RNT birləşdirən zülallarda tapılmış ümumi motif **sink barmaq** motifi antiparallel orientasiyalı bir α spiral və iki β zəncirdən təşkil olunan üç ikinci quruluşlara malikdir və sink ionları vasitəsi ilə bir yerdə saxlanılan barmağa-bənzər dəstəni əmələ gətirir (Şəkil 3-10C).

Polipeptid zəncirinin birinci quruluşu ilə onun büküldüyü quruluş motifi arasında münasibət həmişə düzgün birbaşa olmur. Verilmiş istənilən quruluş motifini müəyyən edən aminturşu ardıcıllıqları bir-birinə çox oxşar ola bilər. Başqa sözlə, ümumi *ardıcıllıq motifi* ümumi quruluş motifin nəticəsi ola bilir. Bu, spirallaşmış-spiralı əmələ gətirən heptad təkrar üçün olan bir haldır. Amma, zahirən uyğun olmayan aminturşu ardıcıllığının sadə quruluş motifinə bükülməsi mümkündür, ona görə də hansı aminturşu ardıcıllığının verilmiş quruluş motifində büküləcəyini əvvəlcədən demək həmişə mümkün olmur. Əksinə, çox rast gəlinən ardıcıllıq motifinin dəqiq müəyyən olunmuş quruluş motifinə çevrilməsi mümkündür. Bəzən, hər hansı amin turşusunun, məsələn, prolinin və ya aspartatın yaxud qlutamatın qeyri adi bolluğuna malik olan qısa ardıcıllıq motifləri, "domenlər" adlandırılır; amma, bu və digər eyni hüdudlara malik olan (ardıcıl bitişik olan) seqmentlər qanunauyğun olaraq "domen"dən daha çox, fərqli mənaya malik olan və aşağıda müzakirə olunan "ardıcıllıq motifləri" adlandırılır.

Biz, bu fəsildə və digər fəsillərdə başqa zülalların sonrakı müzakirələrində bir sıra əlavə motiflərlə qarşılaşacağıq. Eyni funksiyaya malik olan müxtəlif zülallarda, eyni quruluş motiflərinn mövcud olması açıq şəkildə göstərir ki, ikinci quruluşun bu cürə faydalı kombinasiyası təakamül prosesində qorunub saxlanmışdır.



ŞƏKİL 3-10 Zülalın ikinci quruluş motifləri. (a) Bu iki-zəncirli paralel spirallaşmış-spiral motif (*solda*) bir-birinə sarılmış iki α spiralla xarakterizə olunurlar. Spiralın kiplləşdirilməsi hər iki spiral boyunca müntəzəm intervalda mövcud olan və bir-birinə sarınmış spiralların qovşaq yerlərində tapılmış hidrofob yan zəncirlərin (qırmızı və göy) qarşılıqlə əlaqəsi ilə stabilləşir. Qeyd olunduğu kimi, hər bir α spiral 1 və 4-cü qalıqlar vəziyyətində adətən, amma həmişə deyil, hidrofob qalıqlardan ibarət olan xarakterik heptad təkrar ardıcıllığı nümayiş etdirir. Bu quruluş motifin spirallaşmış-spiral təbiəti çox belə motiflərə malik olan (*sağda*) daha uzun spirallaşmış-spiralda aydın görünür. (b) Spiral-ilgək-spiral motifli EF-əl xüsusi konformasiyada qısa ilgəklərlə bağlanmış iki spiraldan təşkil olunub. Bu cürə quruluş motifi çox sayda müxtəlif zülallar üçün, o cümlədən müxtəlif kalsium-birləşdirən zülallar və DNT-birləşdirən tənzimləyici zülallar üçün xarakterik olan ümumi quruluşdur. Kalmodulin kimi kalsium-birləşdirən zülallarda, turşu qlutamat- və aspartat-zəngin ilgəklərdə beş qalığın oksigen atomları və bir su molekulu Ca^{2+} ionları ilə ion əlaqələrini yaradır. (c) Sink-barmaq motif çox DNT-birləşdirən zülallarda vardır və transkripsiyanın tənzimlənməsini həyata keçirir. Zn^{2+} ionu bir cüt β zəncirlər arasında (mavi) və bir α spiral (qırmızı) arasında bir cüt sistein və bir cüt histidin qalıqları vasitəsi ilə saxlanılır. İki invariant sistein qalıqları 25 qalıqlı bu motifin 3 və 6-cə vəziyyətində, iki invariant histidin qalıqları isə 20 və 24-cü vəziyyətində olurlar. [(a) hissəsi verilənləri L. Gonzalez, Jr., D. N. Woolfson, and T. Alber, 1996, *Nat. Struct. Biol*. **3**:1011–1018, PDB IDs 1zik and 2tma-dən. (b) hissə verilənləri R. Chattopadhyaya et al., 1992, *J. Mol. Biol*. **228**:1177–1192, PDB ID 1cll-dən. (c) hissə verilənləri S. A. Wolfe, R. A. Grant, and C. O. Pabo, 2003, *Biochemistry* **42**:13401–13409, PDB ID 1llm-dən

Domenlər Üçüncü Quruluşun Modullarıdır

Zülaln quruluşunun müxtəlif rayonları bir çox hallarda **domenlər** adlandırılır. Zülal domenlərinin üç əsas sinifi vardır: funksional, quruluş və topoloji domenlər. ***Funksional domenlər*** zülalın müəyyən nahiyəsi olub, adətən, hətta zülalın qalan hissələrindən ayrıldıqda belə, bu zülal üçün xas olan fəallığı göstərir. Məsələn, zülalın xüsusi bir hissəsi ola bilsin ki, onun katalitik fəallığı üçün cavabdehdir, onu həyata keçirir, (məsələn kinaza domeni fosfat qrupunu kovalent rabitə ilə başqa molekullara birləşdirir) və ya onun birləşdirmə qabliyyətini həyata keçirir (məsələn DNT birləşdirici domen və ya membran birləşdirən domen). Zülalların funksional domeni əksər hallarda, hədəf polipeptiddə bir və ya bir neçə peptid əlaqəsini doğrayan **proteaza** fermentlərinin köməyi ilə tədricən onun ən kiçik funksional fraqmentinə çatana kimi kəsmək, "yonmaqla" eksperimental yolla təyin edilə bilir. Alternativ olaraq, zülalı kodlaşdıran DNT elə modifikasiya oluna bilər ki, modifikasiya olunmuş DNT zülalı sintez etmək üçün istifadə olunanda tam uzunluqlu zülalın yalnız nəzərdə tutulmuş müəyyən hissəsi və ya domeni sintez olunsun. Beləliklə, bütöv zülalın xüsusi fəallıqlara cavab verən spesifik hissələrini təyin etmək mümkündür. Həqiqətən də, funksional domenlər çox hallarda müvafiq quruluş domenləri ilə əlaqəli olurlar.

Quruluş domeni təxminən ~40 və ya daha artıq amin turşusu qalığı uzunluqda olan rayon olub tək, stabil və fərqli quruluşda təşkil olunmuşdur, əksər hallarda bir və ya daha artıq ikinci quruluşudan ibarət olur. Çox quruluş domenləri onların yerləşdiyi zülalın başqa nahiyələrindən asılı olmayaraq xarakterik quruluşda bükülürlər. Bunun nəticəsində, fərqli quruluş domenləri bir çox hallarda, qısa və ya uzun speyserlərlə bir yerə əlaqələndirilərək böyük çoxdomenli zülalı əmələ gətirirlər. Məsələn, qrip virusunun trimer hemaqluteninində hər bir polipeptid zənciri həm qlobulyar domenə həm də fibrilyar domenə malikdir (Şəkil 3-11a). Quruluş domenləri modullar kimi müxtəlif zülallarda inkorporasiya ola bilirlər. Zülalların arxitekturasına modulyar yanaşma, müxtəlif fəallıqlara malik olan müxtəlif domenlərin mozaik quruluşuna meyilli olan və beləliklə eyni zamanda müxtəlif funksiyaları həyata keçirə bilən böyük zülalları tanımağı xüsusən asanlaşdırır. Eukariotlarda olan zülalların 70 faizə qədər böyük bir hissəsi çoxsaylı quruluş domenlərinə malikdirlər. Quruluş domenləri çox hallarda eyni zamanda funksional domenlərdir, belə ki onlar zülalın qalan hissələrinin olmasından asılı olmayaraq fəallığa malikdirlər.

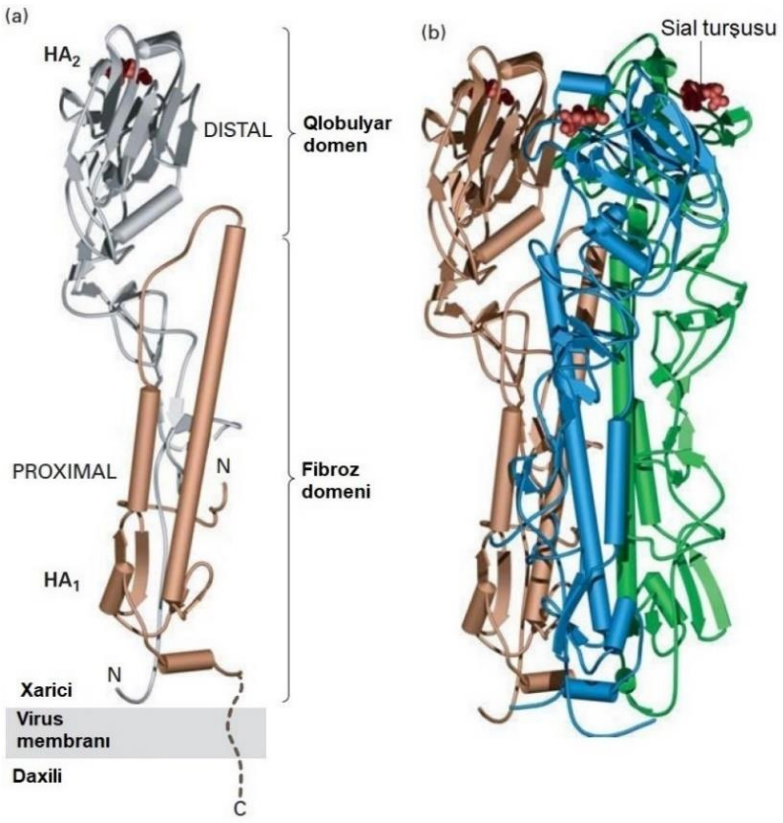
Epidermal boy faktoru (EGF) domeni bir sıra zülallarda mövcud olan quruluş domenidir (Şəkil 3-12). EGF kiçik, suda həll ola bilən peptid hormon olub embrionda hüceyrəyə, yetkin insanlarda isə dəri və birləşdirici toxumalara birləşərək onların bölünməsinə səbəb olur. O, membrana sarınmış domenlərlə hüceyrə mmbranına bağlanmış EGF səlәf zülalda təkrarlanan EGF domenlərin proteolitik fermentlərlə kəsilməsi nəticəsində (peptid əlaqələrini qırmaqla) yaranır. Ardıcıllığına görə EGF peptid hormonlara oxşar oaln amma onlarla identik olmayan EGF domenlər başqa zülallarda da mövcuddur və proteolizlə asanlıqla azad edilə bilirlər. Bu zülallara, infarkt zamanı xəstələrdə qan laxtalarını dağıtmaq üçün istifadə edilən propteaza toxuma plazmogen aktivator (TPA) zülalı, Embrional differensasiyada iştirak edən Neu zülallar, inkişaf prosesinin mühüm siqnallarının ötürülməsində iştirak edən plazma membranında reseptor zülalı Noç zülal (bax Fəsil 16) daxildirlər. Bu zülallar EGF domenlə yanaşı, başqa zülallarda da ümumi olan digər domenlərə də malikdirlər. Məsələn, TPA, bəzi proteazalarda funksional domen olan trypsin domeninə malikdir. Belə guman olunur ki, bütün zülallarda minə yaxın müxtəlif quruluş domenləri mövcuddur. Bunlardan bəziləri bütün zülallar üçün ümumi olmadığı halda bəziləri isə çoxsaylı müxtəlif zülallarda tapılmışdır. Həqiqətən də, bəzi hesablamalara görə yalnız doqquz əsas tip quruluş domenləri bütün zülallarda olan quruluş domenlərinin üçdə birini təşkil edir. Quruluş domenlərinin quruluşu rentgen-kristalloqrafiya yolu ilə, və ya nüvə maqnit rezonansı (NMR) yolu ilə öyrənilmiş zülallarda və ya zülalların elektron mikroskopu ilə çəkilmiş şəkillərində tanımaq – aşkar etmək olur.

Zülalın butun nahiyələrinə olan fərqli məkan münasibətləri ilə təyin olunan zülal rayonları zülalların ***topoloji domenləri*** adlanır. Məsələn, hüceyrə-səth membranı ilə assosasiyada olan bəzi zülalların hüceyrədə sitoplazmaya uzanan (sitoplazmatik domen), membranın lipid-ikiqatlısına batmış (membrana sarınmış domen) və hüceyrə xaricinə genişlənmiş (hüceyrəxarici domen) hissələri vardır. Bu hissələrin hər biri bir və ya bir neçə quruluş və funksional domenlərindən ibarət olurlar.

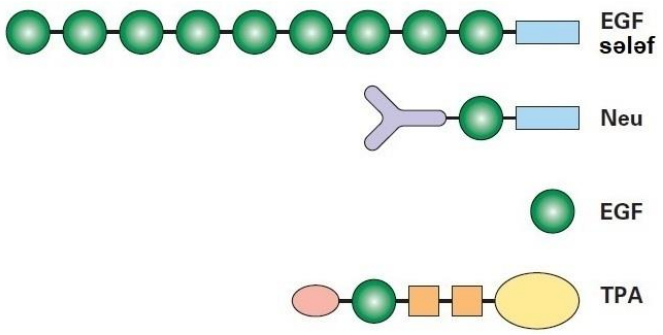
Fəsil 8-də biz, domenlərə uyğun olan gen seqmentlərinin təkamül prosesində qarışaraq nəticədə, onların çox zülallarda ortaya çıxması mexanizminə baxırıq. Funksional, quruluş və topoloji domenlər hər hansı bir zülalda identifikasiya və xarakterizə olunduqdan sonra, alınan məlumatları oxşar domenlərun başqa zülallarda axtarılmasında istifadə etmək olar və bu domenlərin həmin zülallarda potensial oxşar funksiyalarını əvvəlcədən demək olar.

Çoxsaylı Polipeptidlər Dördüncü Quruluşda və Supermolekulyar Komplekslərdə Toplanırlar

Multimer zülallar iki və daha artıq polipetid zəncirindən təşkil olunurlar və bu kontekstdə onlar *subvahidlər* adlanırlar. Quruluş təşkilinin dördüncü səviyyəsi, dördüncü quruluş multimer zülallarda subvahidlərin sayını (stoixiometriya) və subvahidlərin multimerdə nisbi yerləşmə mövqeyini təsvir edir (Şəkil 3-2). Məsələn, qripp virusunun hemoqlutenini üç identik subvahidin (homotrimer) əmələ gətirdiyi, qeyri kovalent əlaqə ilə bir yerdə saxlanılan trimer zülaldır (bax Şəkil 3-11b). Başqa multimer zülallar müxtəlif sayda eyni (homomer) və ya fərqli (heteromer) subvahidlərdən təşkil oluna bilirlər. Qanda oksigen daşıyan molekul, hemoqlobin heteromer multimer zülallara aid bir nümunədir. O, hər biri iki eyni nüsxədən təşkil olunmuş iki fərqli polipeptid zəncirə (aşağıda müzakirə olunur) malikdir. Multimer zülalların fərdi monomer subvahidləri çox hallarda multimerdə toplanmadıqları halda normal funksional olmurlar. Başqa hallarda multimer zülalda toplanmaq, metabolik və ya siqnal yolunda ardıcıl tfəaliyyət göstərən zülallara onların məkanda yerləşmə vəziyyətlərinə görə fəaliyyət göstərmələrinin səmərəliliyini artırmaq üçün imkan verir, bu hadisə *metabolik cütləşmə* adlanır. Bu cütləşmənin klassik nümunəsi kimi yağ turşularının sintezini, o cünlədən göbələklərdə yağ turşularını sintez edən fermentlər poliketid sintazaları, bakteriyalarda poliketidlər adlandırılan çoxsaylı müxtəlif farmokoloji molekullar dəstini, o cümlədən antibiotik eritromitsini sintez edən daha böyük multi-zülal komplekslərini göstərmək olar.



ŞƏKİL 3-11 Üçüncü və dördüncü quruluş səviyyələri. Burada şəkili verilmiş zülal, hemaqlutanin (HA) qrip virusunun örtüyündə tapılmışdır. Bu, uzun, çoxölçülü zülal üç identik subvahidə malikdir, hər bir subvahid iki polipeptid zəncirdən HA_1 və HA_2 ibarətdir. (a) HA subvahidin üçüncü quruluşu onun spirallarının və zəncirlərinin, 13.5 nm uzunluqlu kompakt quruluşda bükülməsi nəticəsində əmələ gəlmişdir və iki domenə bölünür. Membrandan-uzaq domen (gümüşü) qlobulyar konformasiyada bükülmüşdür. Membrana yaxın domen (qızılı) sütunabənzər fibrilyar konformasiyaya malikdir və HA_2-də iki uzun α spiralın (silindirlər), HA1-də isə β zəncirlərin düzlənməsi nəticəsində əmələ gəlmişdir. (b) HA-nın dördüncü quruluşu üç subvahidin (qızılı, mavi və yaşıl) fibrilyar domenində uzun spirallar (silindirlər) arasındakı lateral (yan) qarşılıqlı əlaqələrin hesabına üçzəncirli spirallaşmış-spiral sütun əmələ gətirərək stabilləşir. Hədəf hüceyrədə HA-nın uzaq qlobulyar domenlərinin hər biri salsil turşusunu birləşdirir (qırmızı). Çoxsaylı başqa müxtəlif membran zülallar kimi, HA da, bir neçə kovalent birləşmiş karbohidrat zəncirinə malikdir (burda göstərilməyib). [Verilənlər S. J. Gamblin et al., 2004, *Science* **303**:1838–1842, PDB ID 1ruz-dan.]



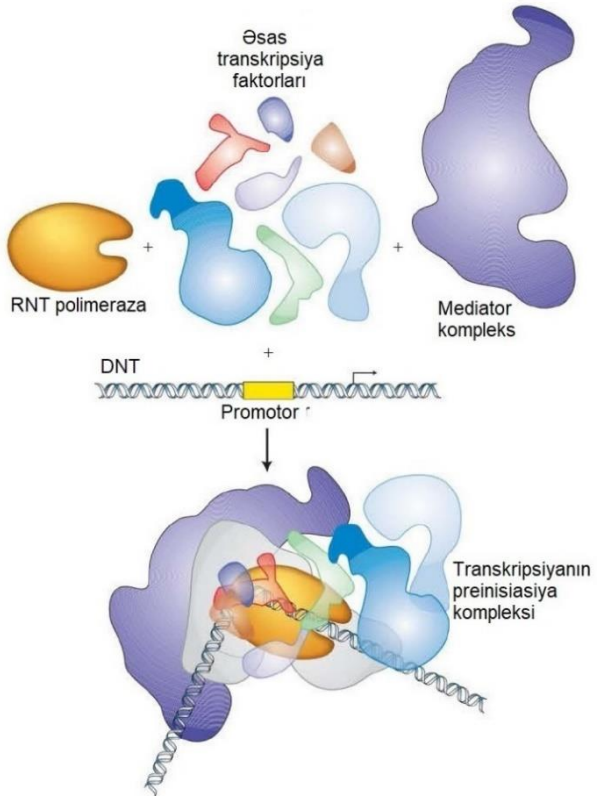
ŞƏKİL 3-12 Zülal domenlərinin modulyar təbiəti. Epidermal boy faktoru (EGF), müxtəlif EGF domenlərə (yaşıl) və membrana dolanan domenlərə (göy) malik olan səlәf zülalın proteolitik kəsilməsi yolu ilə əmələ gəlir. EGF domen həmçinin Neu zülallarında və toxuma plazminogen aktivatoru (TPA) zülallarında da mövcuddur. Bu zülallar həmçinin, forma və rəngləri ilə qeyd olunmuş, başqa geniş yayılmış domenlərə də malikdirlər. Bax L.D.Campbell and P.Bork, 1993, *Curr.Opin.Struc.Biol.* 3:385

Zülalların quruluşunun ən yüksək ierarxiyası zülalların supermolekulyar komplekslərdə toplanmasıdır. Adətən, belə quruluşlar çox böyük olur, bəzi hallarda zülalın kütləsi 1 meqadaltondan (Mda) da böyük olur, ölçüsü isə 30-300 nm qədər yaxınlaşa bilir və onlarla və yüzlərlə polipeptid zəncirlərdən və bəzən də başqa biopolimerlərin məsələn nuklein turşularının qatışığından təşkil olunurlar. Virus genomunun nuklein turşularını örtən kapsid öz quruluş funksiyası ilə supermolekulyar kompleksə bir nümunədir. Plazma membranına forma verən və onu saxlayan sitoskelet filamentlərin dəsti başqa bir misaldır. Başqa supermolekulyar komplekslər molekulyar maşın kimi fəaliyyət göstərirlər, hər biri ayrıca funksiyaya malik olan müxtəlif zülallar böyük kompleks şəkilində inteqrasiya edərək hüceyrənin əsas kompleks proeslərini aparırlar. Məsələn, transkripsiya maşını DNT templeytdən istifadə edərək məlumat RNT-nin (mRNT) sintezini həyata keçirir. Quruluşu və fəaliyyətinin detalları Fəsil 5 və 9-da ətraflı müzakirə olunan bu transkripsiya maşını multimer zülal olan RNT polimerazanın özündən və ən azı 50 əlavə komponentdən, o cümlədən əsas transkripsiya faktorlarından, promotora-birləşən zülallardan, helikazalardan və başqa zülal komplekslərindən təşkil olunub (Şəkil 3-13). Fəsil 5-də müzakirə olunan multimer ölçülü, çox-zülallı və çox-nuklein turşulu kompleksdən ibarət olan maşın ribosomlar da zülalları sintez edir. Çoxsaylı multizülal komplekslərdən biri də nüvə məsamələri (nukleopor) kompleksidir, bu quruluş nukleoplazma və sitoplazma arasında əlaqəni və makromolekulların daşınmasına şəraiti yaradır (bax Fəsil 14). O, təxminən 30-a qədər müxtəlif zülalın çoxsaylı nüxsələrindən təşkil lunub molekul şəkisi 50 meqadalton (MDA) ətrafındadır. Yuxarıda qeyd olunan, yağ turşularının sintezi və poliketid sintezi də supermolekulyar maşınlar hesab edilirlər.

Zülalın Ardıcıllığının və Quruluşunun Müqayisəsi Zülalların Funklsiyasını və Təkamülinü Anlamağı Təmin Edir

Çoxsaylı müxtəlif zülalların analizi zülalların aminturşu ardıcıllığı, üç-ölçülü quruluşu və funksiyaları arasında qəti şəkildə əlaqələrin olduğunu aşkar etdi. Belə bir ilkin nümunə kimi iki oksigen daşıyan zülalın – əzələdə myoqlobinin və

qırmızı qan hüceyrələrində hemoqlobinin müqayisəsini gstərmək olar. Rentgen-kristalloqrafiya analizləri göstərdi ki, myoqlobin – monomer (bir polipeptid zəncirindən/zülal molekulundan təşkil olunub) və hemoqlobin – tetramer (hər bir zülal iki α və iki β polipeptiddən və ya subvahidlərdən $\alpha_2\beta_2$ ibarət tetramer), hər ikisi hər bir subvahidə qeyri kovalent birləşmiş hem qrupa malikdir (Şəkil 3-14a). Hem qrup oksigenə birləşir. Hemoqlobinin β zəncirini kodlaşdıran gendə valin amin turşusunun qlutamin turşusu ilə əvəz olunmasıyla aparılan mutasiya bu zülalın bükülməsində dəyişikliyə səbə olmuş, nəticədə onun funksiyası pozulmuş və öraqşəkilli-hüceyrə xəstəliyi (həmçinin öraqşəkilli-hüceyrə anemiyası adlanır) yaranmışdır. Myoqlobinin 141 qalığının və hemoqlobinin β subvahidinin 153 qalığının ardıcıllığının düzgün düzlənməsi ekvivalent mövqelərdə 40 eyni qalığa malikdir, 21 qalığın isə kimyəvi cəhətdən çox oxşar olan yan zənciri vardır. Belə yüksək dərəcədə identiklik və oxşarlıq (myoqlobin qalıqlarının 43 faizi) onların oxşar oksigen birləşdirmək qabliyyəti ilə uzlaşır. Rentgen kristalloqrafiya analizləri gstərdi ki, myoqlobinin və hemoqlobinin α və β subvahidlərinin üç-ölçülü quruluşu, eləcə də təkamül prosesində uzaqlaşmış, bitkilərdə oksigen daşıyan leqhemoqlobin təccüləndirici dərəcədə oxşardırlar (Şəkil 3-14a).



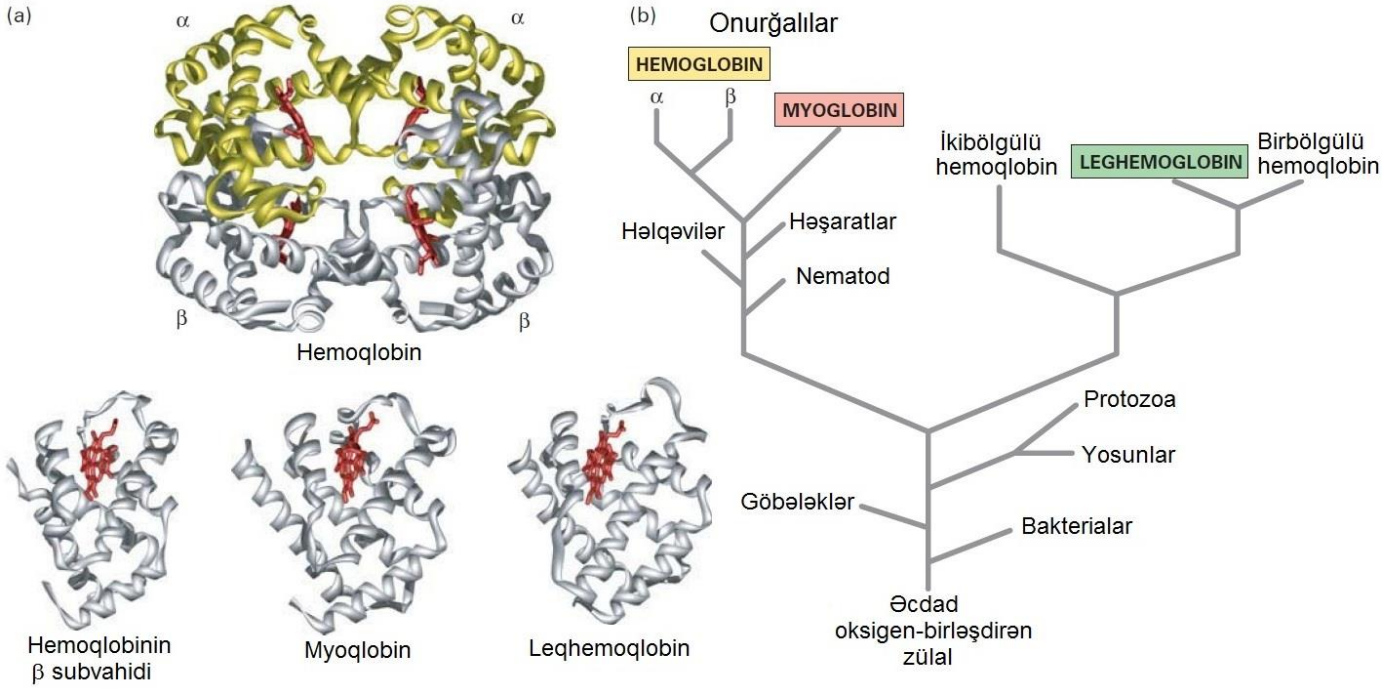
ŞƏKİL 3-13 Molekulyar maşın: transkripsiyanın inisiasiyası kompleksi. Əsas RNT polimeraza, ümumi transkripsiya faktorları, 20-ə yaxın subvahiddən təşkil olunmuş vasitəçi kompleks və burada göstərilməyən digər zülal kompleksləri DNT-də promotorda toplanırlar. Polimeraza DNT-nin transkripsiyasını aparır, polimerazanın ilkin olaraq promotora bağlanması üçün, assosasiyada olan başqa zülallar tələb olunur. Çoxsaylı müxtəlif komponentlər birlikdə maşın kimi fəaliyyət göstərirlər.

Yaxşı bir qayda odur ki, iki polipeptid zəncirin ardıcıllığındakı oxşarlıq nə qədər böyük olursa, onların oxşar üç-ölçülü quruluşa və oxşar funksiyalara sahib olması ehtimalı da bir o qədər çox olur. Bu müqayisəli yanaşmanın çox güclü olmasına baxmayaraq, oxşar quruluşa və funksiyaya malik olan bir zülalı və ya zülalın bir hissəsini, sadəcə amin turşu ardıcıllığının oxşarlığına görə başqa bir zülala aid edərkən ehtiyatlı olmaq lazımdır. Başqa zülallar arasında aparılan oxşar müqayisəlr sonda, zülalın aminturşu ardıcıllığı, üç-ölçülü quruluşu və funksiyası arasında əlaqənin olduğunu təsdiq etdi. Zülalların funksiyasının öyrənilməsi üçün ardıcıllığın müqayisəli analizindən istifadə oluması son illərdə, getdikcə daha çox orqanizmlərdə genomun ardıcıllığının oxunması ilə əhəmiyyətli dərəcədə genişləndirilmişdir. Məsələn, nümunələr var ki, oxşar ümumi quruluşa malik olan bəzi zülallar fərqli funksiyalara malikdirlər, və elə hallar da vardır ki, bizim aşağıda müzakirə edəcəyiçiz kimi, funksiyasına grə qohum olmayan və tamam fərqli aminturşu ardıcıllığına malik olan zülallar çox oxşar bükülmüş üçüncü quruluşa malikdirlər. Bununla belə, bu cürə müqayisələr çox hallarda zülalların quruluş və funksiyalarının problemləri haqqında əhəmiyyətli məlumat; təmin edir.

Zülalların quruluşunu və funksiyasını izah etmək üçün ardıcıllığın müqayisə olunmasının istifadəsi son illər getdikcə daha çox orqanizmlərdə genomların və məlumat RNT-lərin ardıcıllığı oxunduqca əhəmiyyətli dərəcədə genişlənmiş, büyk miqdarda zülallar ardıcıllığının açılmasına imkan vermişdir. Həqiqətən də, iyirminci əsrin sonuncu onilliklərində biologiyada olan molekulyar təkamul (ikişaf) bioloji təsnifatın zülalların aminturşu ardıcıllığının oxşarlığına və fərqlərinə əsaslanan yeni sxemini yaratdı. Ümumi əcdada malik olan zülallar **homoloqlar** adlandırıldı. Zülallar arasınad **homologiyanın** olması və beləliklə onların ümumi əcdadının olması haqqında əsas dəlili onlardakı ardıcıllığın oxşarlığıdır ki, bu da əksər hallarda oxşar quruluşların əmələ gəlməsində ortaya çıxır. Biz, zülal "ailəsinə" daxil olan homoloji zülalları təsvir edə bilirik və onların mənşəini, ardıcıllıqlarını müqayisə edərək onların hüceyrə xəttini, bu zülalların təkamül baxımından bir-biribnə necə yaxın və ya uzaqda olmalarını izləyə bilirik. Ümumiyyətlə, təkamül prosesində zülalları kodlaşdıran genlərdə mutasiyalar toplandığından bir-birinə daha yaxın olan zülalların bir-birindən uzaq olan zülallarla müqayisədə ardıcıllıqları daha yüksək dərəcədə oxşarlığa malik olacaqdır. Homoloji zülalların birinci quruluşunun hissələri daha az ardıcıllıq homologiyasına malik olsalar da, onların bükülmüş üç-ölçülü quruluşu oxşar ola bilər. Əvvəlcə nisbətən yüksək ardıcıllıq oxşarlığına və oxşar funksiyaya və ya quruluşa malik olan zülallar (>50 faiz bir-birinə uyğun gələn və ya eyni olan) təkamül cəhətdən ***qohum ailələr*** kimi təyin edildiyi halda, iki və daha artıq ailəni əhatə edən ***superailə***də ailələr arası ardıcıllıqdakı oxşarlıq bir ailə daxilindəki ardıcıllığa nisbətən daha azdır (~30-40 faiz oxşarlıq). Ümumiyyətlə belə guman edilir ki, ardıcıllığı 30 faizə qədər oxşar olan zülallar oxşar üç-ölçülü quruluşa malikdirlər, amma, zülalların oxşar quruluşu alması üçün ardıcıllıqda belə yüksək dərəcədə oxşarlığın olması tələb olunmur. Son zamanlar, ***ailə*** və ***superailəyə*** yenidən baxılması nəzərdə tutulur, belə ki, ailəni təşkil edən zülallar təkamülcə təmiz yaxın olan zülallar olduğu halda (>30 faiz oxşarlıq və ya əlavə quruluş və funksional informasiya ümumi mənşənin olduğunu, amma <30 faiz identikliyi göstərir), superailə təkamüldə yalnız ehtimal olunan, ümumi mənşəyə malik olan zülalları əhatə edir -

məsələn, ardıcıllıqda oxşarlıq aşağı faiz olur, amma bir və ya daha artıq ümumi motifə və ya domenə malik olurlar.

Homoloji zülallar arasındakı qohumluq, ardıcıllıq analizinə əsaslanan üç diaqramla asanlıqla vizuallaşdırılır. Məsələn, qlobinlərin - hemoqlobin, myoqlobin və onların bakteriyalardakı, bitkilərdəki və heyvanlardakı qohumlarının aminturşu ardıcıllığı göstərir ki, onlar təkamüldə monomer, oksigen birləşdirən əcdad zülaldan törəmişlər (Şəkil 3-14b). Zaman ötdükcə bu əcdad zülalın geni tədricən dəyişmiş və ilkin olaraq ayrılaraq (divergensiya edərək) heyvan və bitki qlobulinlərinin yaranamasına aparan xətləri yaratmışdır. Sonrakı dəyişilmələr, əzələlərdə oksigen saxlayan monomer zülal myoqlobinin və onurğalılarada qan dövranı sisteminin tetramer ($\alpha_2\beta_2$) hemoqlobin molekulunun α və β subvahidlərinin yaranmasına səbəb olmuşdur.



ŞƏKİL 3-14 Qlobin zülal ailəsinin təkamülü. (a) Hemoqlobin iki α və iki β subvahidlərin tetrameridir. Bu subvahidlərin, monomer zülallar olan leqhemoqlobin və myoqlobinlə quruluş oxşarlığı şübhəsizdir. Hər iki qlobin polipeptidə qeyri kovalent birləşmiş hem molekulu (qırmızı), bu zülallarda oksigen-birləşdirmə qabliyyətini yaradır. (b) Sadə monomer oksigen-birləşdirən zülal qlobin, guman olunur ki, müasir dövrdəki qan hemoqlobininin, əzələ myoqlobininin və bitki leqhemoqlobinlərin əcdadıdır. Ardıcıllıqlarının müqayisəli analizi aşkar etdi ki, qlobin zülalların təkamülü bitkilərin və heyvanların təkamülünün inkişafı ilə paralel olmuşdur. Əsas dəyişikliklər bitki qlobinlərinin heyvan qlobinlərindən və myoqlobinin hemoqlobindən divergensiya edərək ayrılması ilə ortaya çıxmışdır. Sonralar genlərin duplikasiyası hemoqlobinin α və β subvahidlərinin yaranmasına səbəb olmuşdur. [(a) hissədəki verilənlər G. Fermi et al., 1984, *J. Mol. Biol*. **175**:159–174, PDB ID 2hbb (*hemoglobin*), H. C. Watson, 1969, *Prog. Stereochem*. **4**:299, PDB ID 1mbn (*myoglobin*), and M. S. Hargrove et al., 1997, *J. Mol. Biol*. **266**:1032–1042, PDB ID 1bin *leghemoglobin*).]

3.1 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSIYALARI

Zülalların Quruluşunda İerarxia

- Zülallar amin turşularının bir-birləri ilə peptid əlaqələri lə birləşmiş xətti polimerləridir. Zülallar vahid polipeptid zəncirindən və çoxsaylı polipeptid zəncirilərdən təşkil oluna bilirlər. Polipeptid zəncirin ilkin (birinci) quruluşu zənciri təşkil edən aminturşularının kovalent rabitə ilə birləşmiş ardıcıllığıdır. Amin turşuları arasındakı müxtəlif, əsasən də qeyri kovalent qarşılıqlı əlaqələr xətti ardıcıllıqda zülalın bükülmüş xüsusi üç-ölçülü quruluşunu və ya konformasiyasını stabilləşdirir.
- α spiral, β zəncir və vərəq, və β dönmələr zülalların ikinci quruluşunun geniş yayılmış elementləridir. İkinci quruluş peptid özülün atomları arasındakı hidrogen əlaqələri ilə stabilləşir (bax Şəkil 3-4-dən 3-6 qədər).
- Zülalın üçüncü quruluşu, qeyri polyar yan qruplar arasındakı hidrofob qarşılıqlı əlaqələrin, və polyar yan qruplarla polipeptid özül arasındakı hidrogen və ion qarşılıqlı əlaqələrinin nəticəsində əmələ gəlir. Bu qarşılıqlı təsir zülalın bükülməsini, o cumlədən onun ikinci quruluş elementlərinin ümumi üç-ölçülü düzülüşə keçməsini stabilləşdirir.
- Bütün zülallar və ya zülalların seqmentləri adətən dörd geniş yayılmış quruluş kateqoriyasından birinə: qlobulyar

zülallara, fibrilyar zülallara, inteqral membran zülallarına və nizamsız zülallara düşürlər.

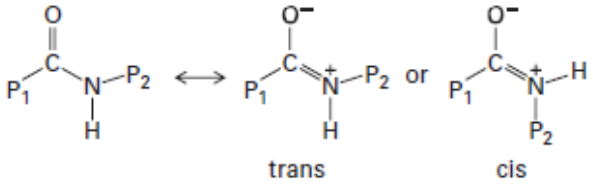
- Daxilən nizamsız zülalların müstəsna konformasiya dəyişkənliyi onların funksiyasına, birləşmə partnyoruna, siqnal molekullarına, başqa molekulların tənzimləyicilərinə, skafoldlara, zülalın yaxşı nizamlanmış rayonları arasında dəyişkən əlaqələrə (linklərə), posttranslyasiya zülal modifikasiyaları saytlarına, avtoingibitorlara və hüceyrədaxili zülal çeşidləməsi üçün siqnallara kmək edir.
- İkinci quruluşun müəyyən kombinasiyaları, müxtəlif zülallarda tapılmış və çox zaman zülalın spesifik funksiyası ilə əlaqəli olan müxtəlif quruluş motiflərinin yaranmasına səbəb olur (bax Şəkil 3-10).
- Zülallar çox hallarda, xüsusi quruluşu, funksiyası və topoloji xüsusiyyətləri ilə fərqlənən sərbəst bükülmüş müxtəlif domenlərə malik olurlar.
- Təkamülün gedişində domenlərin modullar kimi müxtəlif zülallarda toplanması, zülalların quruluşunda və funksiyasında böyük müxtəlifliyə səbəb olmuşdur.
- Multimer zülallarda fərdi polipeptid subvahidlərin sayı və təşkili zülalların dördüncü quruluşunu yaradır.
- Hüceyrələr, çox zaman molekulyar maşın adlandırılan, çox böyük supermolekulyar quruluşa malik olurlar, burada mürəkkəb hüceyrə prosesləri (DNT, RNT və zülal sintezi, fotosintez, siqnal ötürülməsi və sair) üçün lazım olan bütün iştirakçılar bir yerə yığılaraq birləşirlər.
- Belə hesab etmək olar ki, oxşar aminturşu ardıcıllığına malik olan zülallar, əsasən oxşar üç-ölçülü quruluşa və oxşar funksiyaya malikdirlər. Amma, fərqli aminturşu ardıcıllığına malik olub oxşar üç-ölçülü quruluşda bükülən polietid zəncirləri də vardır.
- Homoloji zülallar ümumi əcdaddan törənən zülallardır və beləliklə oxşar ardıcıllığa, quruluşa və funksiyaya malik olurlar. Onlar ailələrdə və superailələrdə birləşərək təsnifləşdirilə bilirlər.

3.2 Zülalların Bükülməsi

Yuxarıda qeyd olunduğu kimi, sz zülalların arxitekturasına gəldikdə "forma funksiyanın ardınca gedir". Beləliklə, əgər polipeptid bioloji funksiyasını hüceyrə daxilində və ya xaricində yerinə yetirirsə, onun düzgün aminturşu ardıcıllığı ilə sintez olunması və müvafiq ikinci, üçüncü və mümkün olan dördüncü quruluşlarda düzgün üç-ölçülü konformasiyada bükülməsi vacibdir. Zülal münasib amin turşusu ardıcıllığı ilə necə yaradılır? Polipeptid zənciri, sitoplazmada **ribosom** adlanan böyük zülal-nuklein turşusu kompleksi üzərində **translyasiya** adlanan mürəkkəb bir proseslə sintez olunur. Translyasiya zamanı, **məlumat RNT-nin (mRNT)** nukleotid ardıcıllığı müvafiq aminturşu ardıcıllığının yığılması üçün templeyt rolunu oynayır. mRNT isə əvvəlcədən, **transkripsiya** adlanan proseslə sintez olunur, və burada DNT-nin nukleotid ardıcıllığı nüvədə transkripsiya maşını ilə mRNT ardıcıllığına köçürülür. Transkripsiya və translyasiyanın mürəkkəbliyi Fəsil 5-də izah olunur. Biz burada, yeni sintez olunmuş və ya sintezi davam edən polipeptid zəncirin ribosomdan çıxan kimi düzgün bükülməsinin determinantlarını (həlledici faktorlarını) təsvir edirik.

Planar Peptid Əlaqələri Zülalların Bükülə Biləcəyi Formanı Məhdudlaşdırır

Polipeptidlərin quruluşunun kritik xüsusiyyəti polipeptid zəncirn bükülmə qabliyyətini mıhdudlaşdıran peptid əlaqələriin planar (müstəvi) quruluşudur. Şəkil 3-3 polipeptid zəncirindəki peptid əlaqələrində amid qruplarını təsvir edir. Peptid əlaqələri öz-özlüyündə özünü qismən planar ikiqat rabitə kimi apardığından (*ortada və sağda*),



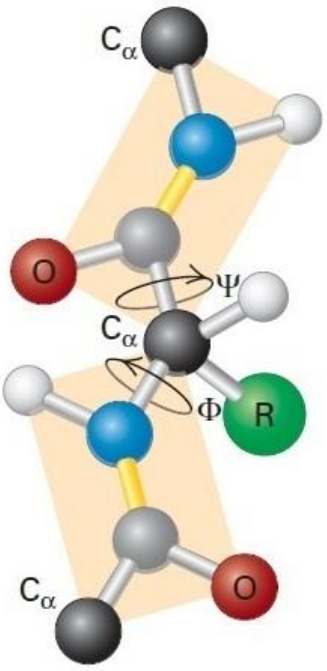
polipeptid zəncirin peptid əlaqəsinin hər iki tərəfində (P_1 və P_2) peptid əlaqəsinə nisbətdə ya trans (*solda*) ya da cis (*sağda*) konfuqurasiyada yönələ bilir. Biz doymamış yağ turşularında karbon-karbon ikiqat rabitələrin oxşar *cis* və *trans* izomerlərini Fəsil 2-də görmüşdük. Kristal quruluşun analizləri gstərir ki, zülallarda P_2 vəziyyətində prolin qalığının olduğu haldan başqa təxminən 99.97 faiz peptid əlaqələri trans konfiqurasiyadadır. (Biz tezliklə ona P_2-də prolin kimi baxacağıq.) Peptid əlaqələrində karbonil qrupunun karbonu və amid qurupunun azotu, və bunların birləşdiyi birbaşa atomlar bir müstəvidə yerləşməlidirlər (Şəkil 3-15), peptid əlaqəsinin özündə kiçik fırlanma mümkündür. Nəticədə, polipeptid zəncirində olan yeganə elastiklik (flexability) – onun burulmasına və dönmələrinə imkan verən və beləliklə, onun fərqli üç-ölçülü formada bükülməsinə imkan verən – onların bir müstəvidə olan yaxın peptid əlaqələrinin təxminən iki rabitədə bir-birinə nisbətdə fırlanmasıdır: C_α - amino azot əlaqəsi (dönmə bucağı Φ adlanır) və C_α - karbonil karbon əlaqəsi (dönmə bucağı Ψ adlanır).

Bununla belə, polipeptid zəncirinin qəbul edə biləcəyi potensial konformasiyalara daha bir məhdudiyyət yalnız məhdud sayda Φ və Ψ bucaqların mümkün olmasıdır, çünki Φ və Ψ bucaqların əksər hissəsində özül və ya yan zəncir atomları bir-birinə çox yaxınlaşacaq, beləliklə də, bunlarla əlaqəli olan konformasiya yüksək dərəcədə qeyri-sabit olacaq, hətta buna fiziki nail olmaq qeyri mümkün olacaq.

Zülalın Amin Turşu Ardıcıllığı Onun Necə Bükiləcəyini Təyin Edir

Özül əlaqələrinin dönmə bucağında qeyri sərbəstlik, görünür çox məhdudlaşdırıcı olduğundan, yalnız bir neçə qalıqdan ibarət olan istənilən polipeptid, prinsipcə hələ də çoxsaylı konformasıyalarda bükülə bilir. Məsələn, əgər Φ və Ψ bucaqları yalnız səkkiz kombinasiyada məhdudlaşırsa, ***n*** - qalıq-uzunluğunda peptid potensial 8^n konformasiyaya malik ola bilər, hətta 10 qalıqdan ibarət olan kiçik polipeptid üçün 8.6 milliona qədər konformasiya mümkündür. Amma, ümumiyyətlə, daxilən nizamsız olmayan hər hansı xüsusi bir zülalın **nativ vəziyyəti** bir konformasiyanı və ya yalnız bir-birinə çox yaxın olan bir neçə konformasiyaları qəbul edir, bütün zülalların əksər çoxluğu üçün nativ vəziyyət molekulun bükülmüş ən stabil formasıdır, bu forma onun normal fəaliyyət göstərməsinə imkan verir.

Termodinamiki baxımdan, nativ vəziyyət ən az sərbəst enerjiyə (G) malik olan konformasiyadır (bax Fəsil 2).



ŞƏKİL 3-15 Zülallarda planar (bir müstəvidə olan) peptid qruplar arasında fırlanma. Cα - amino azot əlaqəsinin (Φ dönmə bucağı) və Cα - karbonilin karbon əlaqəsinin (Ψ dönmə bucağı) fıprlanması polipeptid özülə imkan verir ki, çox böyük miqdarda potensial konformasiyaları alsın. Amma, polipeptid özülüm quruluşundan və amin turşularının yan zəncirinin xassələrindən asılı olan sterik məhdudiyyətlər (fəza məhdudiyyətləri) istənilən zülalın ala biləcəyi potensial konformasiyaları dramatik şəkildə məhdudlaşdırır.

Nativ olaraq yaxşı-nizamlanmış zülalların hansı xüsusiyyətləri onların bu qədər potensial konformasiyalardan yalnız birinin və ya bir neçəsinın bükülməsini məhdudlaşdırır? Yan zəncirlərin xassələri (məsələn, ölçüsü, hidrofobluğu, hidrogen və ion əlaqələrini yaratmaq qabliyyəti) polipeptid özüldə öz xüsusi ardıcıllıqları ilə birlikdə əsas məhdudiyyətləri yaradır. Məsələn, triptofanın yan zənciri kimi böyük yan zəncirlər fəzaca zəncirin bir nahiyəsinin başqa nahiyəsinə qarşı çox yaxın bükülməsinə mane olduğu halda argininində olduğu kimi müsbət yüklənmiş yan zəncirlər, komplementar mənfi yüklənmiş yan zəncirli (məsələn asparagin turşusu) polipeptid seqmentini özünə cəzb edə bilir. Bizim artıq müzakirə etdiyimiz, bşqa bir misal, spiralın assosasiyasını sürətləndirən və nəticədə spirallaşmış-spiralı əmələ gətirən, heptad təkrarlardakı alfatik yan zəncirlərin təsiridir. Beləliklə, polipeptidin ilkin (birinci) quruluşu onun ikinci, üçüncü və dördüncü quruluşlarını müəyyən edir.

Zülalların düzgün bükülməsi üçün lazım olan informasiyanın onun aminturşu ardıcıllığında kodlaşdırıldığı barədə ilk dəlillər təmizlənmiş zülalların yenidən bükülməsi, xüsusən də, 1960-cı illərdə Kristian Anfinsenin Nobel Mükafatına layiq görünən tədqiqatları, RNT-ni kəsən ferment ribonukleaza A-nın yenidən bükülməsi üzərində aparılmış in vitro (sınaq tyublarında) tədqiqatlardan gəlmişdir. Əvvəllər, başqa tədqiqatçılar göstərmişlər ki, müxtəlif kimyəvi və fiziki həyacanlanmalar (perturbasiyalar), zülalların nativ konformasiyasını stabilləşdirən, qeyri-kovalent zəif əlaqələri qıra bilir və onun normal üçüncü quruluşunu itirməsinə səbəb olur. Zülalların quruluşunun dağılması (bura ikinci və üçüncü quruluşlar daxil ola bilir) **denaturasiya** adlanır. Denaturasiya, istilikdən əmələ gələn termal enerji ilə, amin turşularının yan zəncirlərunin yüklərini dəyişən ekstremal (gərgin) pH, və zülalların quruluşunu stabilləşdirən qeyri-kovalent əlaqələrin qırılmasına səbə olan, 6-8 M qatılqda sidik cövhəri və ya quanidin hidroxlorid kimi ***denaturantların*** təsirinə məruz qalmaqla induksiya oluna bilir. Disulfid əlaqələrini qıran β-merkaptoetanol kimi reduksiya edici agentlərin təsirinə məruz qoymaq disulfid-əlaqəsinə malik olan zülalların stabilliyini pozur. Zülal bükülməsinin açılması və ya denaturasiya olunması şəraitində, bir formada bükülmüş zülal molekullarının populyasiyası destablləşir və nəticədə əmələ gələn bükülməsi açılmış və ya denaturasiya olunmuş çoxsaylı müxtəlif qeyri nativ və bioloji cəhətdən qeyri fəal konformasiyalı molekulların kolleksiyasına çevrilirlər. Biz artıq gördük ki, böyük miqdarda, mümkün olan qeyri-nativ konformasiyalar mövcuddur (məsələn 8^n – 1). Zülallarda qeyri-nativ konformasiyanın iki geniş yayılmış sinifinə rast gəlinir: (1) monomer bükülməmiş və ya denaturasiya olunmuş quruluş və (2) aqreqatlar, ya amorf ola bilirlər, ya da sonra bu fəsildə təsvir olunan və xəstəliklə-bağlı olan amiloid liflər kimi yaxşı nizamlanmış quruluşa mali k olurlar. Prinsipcə, aqreqatlar tək bir zülalın çox sayda nüsxələrini əmələ gətirə bilirlər (homogen aqreqatlar), ya da müxtəlif zülalların qatışığından ibarət olurlar (heterogen aqreqatlar).

Denaturasiya edici şəraitdə, denaturasiya etmiş zülalların çoxsaylı qeyri nativ formanı ala bilməsi üzündən meydana gələn entropiyanın əhəmiyyətli dərəcədə artmasını nəzərə alsaq zülalların bükülməsinin spontan şəkildə açılması təccübləndirici deyildir. Amma təccüblü olan odur ki, sınaq şüşəsində, təmizlənmiş bükümü açılmış bir zülal nümunəsi çox ehtiyatla normal şəraitə keçirildikdə (bədən temperaturu, normal pH səviyyəsi, denaturantların qatılığının azaldılması) bəzi denaturasiya olunmuş polipeptidlər spontan şəkildə özünün əvvəlki nativ formasına qayıda, bükülə bilirlər və Anfinsenin təcrübələrindəki kimi, bioloji cəhətdən fəal vəziyyətə keçə bilirlər. Bu cürə yenidən bükülmə təcrübələri, eləcə də kimyəvi yolla sintez olunmuş zülalların normal bükülməsini göstərən tədqiqatlar aşkar etdi ki, zülalın birinci quruluşunda olan informasiya onun düzgün bükülməsini həyata keçirmək üçün kifayətdir. Yeni sintez olunmuş zülalların bükülməsi denaturasiya olunmuş zülalların yenidən bükülməsi kimi baş verir. Bölmə 3.1-də qeyd olunmuş, oxşar aminturşu ardıcıllığına malik olan zülalların bükülmüş üç-ölçülü quruluşunun müşahidə olunan oxşarlığı, zülalların ilkin quruluşunun onların in vivo bükülməsini təyin etməsi barədə əlavə dəlilləri təmin edir. Aşkar edilmişdir ki, ikinci quruluşun və quruluş motiflərinin formalaşması zülalların bükülməsi prosesinin əvvəlində baş verir və bunun ardınca daha mürəkkəb quruluş domenlərinin yığılması ilə davam edir və daha mürəkkəb üçüncü və dördüncü quruluşları əmələ gətirir (Şəkil 3-16).

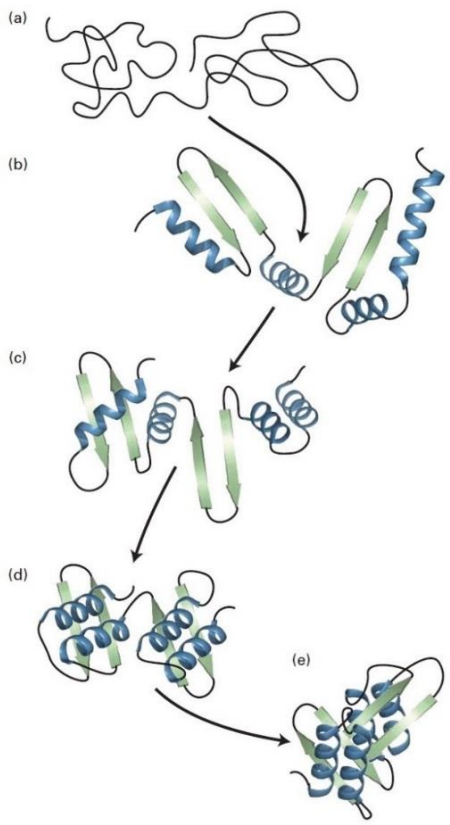
Zülalların in vivo Bükülməsi Çaperonlarla Təşviq Olunur.

Təmizlənmiş denaturasiya olunmuş zülalın sınaq tyublarında yenidən bükülməsi şəraiti yeni sintez olunmuş polipeptidin hüceyrə daxilində bukulməsi şəraitindən əhəmiyyətli dərəcədə fərqlənir. Başqa biomolekulların iştirakı, hansıki bəziləri hələ yeni sintez olunur və bükülmə prosesindədirlər, potensial olaraq, əks halda yaxşı-nizamlanmış zülalların avtonom şəkildə spontan bükülməsinə təsir edərək aqreqatları əmələ gətirə bilirlər. Bəzi zülalların sitozolda qatılığı yüksək dərəcədə fərqlənir və sitozolda ümumi zülalların qatılığı məməlilərin hüceyrələrində ~300 mg/ml ola bilir. Zülalın belə yüksək qatılığı, yeni sintez olunan zülalın öz bükülməsini başa çatdırmazdan öncə başqa zülallarla qarşılaşması şansını artırır və aqreqat əmələgətirmə ehtimalını yüksəldir. Bükülməmiş və qismən bükülmüş zülallar, çox zaman suda-həllolmayan kütlə şəkilində çox böyük aqreqatlar əmələ gətirməyə meyilli olurlar və zülalların bu aqreqatlardan dissosasiya edərək müvafiq (düzgün) konformasiyada bükülməsi çətin olur. Qismən, bu aqreqat əmələgəlmə hidrofob yan zəncirlərin imkan tapıb bükülmüş zülalın daxili özəyinə batıb gizlənə bilməməsi və təsirlərə məruz qalması səbəbindən baş verir. Müxtəlif molekullarda açıq qalan hidrofob yan zəncirlər hidrofob qarşılıqlı təsirlər nəticəsində bir-birinə yapışacaq (bax Fəsil 2) və aqreqasiyanı sürətləndirəcək. Belə aqreqasiyalar üçün risk, düzgün bükülməsini başa çatdırmayan yeni sintez olunan zülallarda xüsussən daha yüksəkdir.

Daxilən nizamsız zülalların aqreqatlar əmələgətirmə ehtimalı daha aşağıdır, çünki onlar ən azı bəzi hallarda bü cürə aqreqasiyanı həyata keçirən daha az hidrofob yan zəncirlərə malik olurlar. Hərçənd ki, zülalın yaxşı-nizamlanmış nativ vəziyyətdə bükülməsi in vitro baş verə bilər, amma bu zülalın bükülə biləcəyi çox böyük sayda potensial düzgün bükülməmiş aralıq konformasiyalarına görə bütün açılmış molekullarda eyni zaman çərçivəsində baş vermir.

Belə maneələri nəzərə alaraq, hüceyrələr zülalların amin turşu ardıcıllıqlarının təmin edə biləcəyi formadan daha mükəmməl formada bükülməsi üçün daha sürətli, və səmərəli mexanizmi tələb edir. Bu cürə mexanizmin olmaması şəraitində, hüceyrələr, düzgün bükülməmiş, qeyri funksional zülalların, sintezi üçün boş yerə daha çox enerji sərf edərdilər, hüceyrənin normal funksiyasının pozulmaması üçün onlar dağıdılmalı olardılar. Hüceyrə daxilində olan zülalların 95 faizdən çoxu özlərinin nativ konformasiyasında olduğundan, aydındır ki, hüceyrələr belə mexanizmə malikdirlər. Düzgün bükülməyən və ya bükülə bilməyən zülallar, məsələn aminturşu ardıcıllığının dəyişilməsi ilə başa verən mutasiya olunmuş genlərlə kodlaşdırılan zülallar çox zaman bükülməmiş kimi tanınır və fermentlər vasitəsi ilə sürətlə parçalanır. Hüceyrənin düzgün zülal bükülməsinin təşkilindəki bu cürə qeyri adi səmərəliliyinin izahı ondadır ki, hüceyrələr **çaperonlar** adlandırılan zülallar dəstini yaradırlar, onlar da yeni sintez olunmuş zülalların düzgün bükülməsini təmin edirlər. Zülalların düzgün bükülməsini çaperonların asanlaşdırmasının bir yolu onların hədəf polipeptidə birləşərək aqreqasiya olunmasına mane olmaları və yeni sintez olunmuş zülala düzgün bükülmək üçün zaman verməleridir. Çaperonların əhəmiyyəti aparılmış tədqiqatlar zamanı qeyd olunmuşdur və bunların əksəriyyəti təkamül prosesində qorunub saxlanmışdır. Çaperonlar bakteriyadan insana qədər bütün orqanizmlərdə tapılmışlar və bəziləri yüksək ardıcıllıq oxşarlığına görə homoloqdurlar və zülalların bükülməsindəki iştirakına görə identikdirlər.

Çaperonlar yeni istehsal olunmuş zülalların funksional konformasiyada bükülməsini həyata keçirə bilir, səhv bükülmüş və ya bükülmü açılmış zülalın yenidən funksional konformasiyada bükülməsini, səhv bükülmə nəticəsində əmələ gəlmiş, potensial toksik zülal aqreqatlarının dağılmasını və böyük çoxzülallı komplekslərin sökülməsini həyata keçirirlər, bəzi zülalların isə fəal və qeyri fəal formalar arasında transformasiya olunmasında vasitəçi rolunu oymnayırlar. Eukariotlarda bütün hüceyrə hissələrində və orqanoidlərdə yerləşən çaperonlar, həmçinin substartalar və ya müştəri zülallar adlanan hədəf zülallara birləşərək onların bükülməsinə kömək edirlər. Çaperonlar, öz funksiyalarında ATP birləşdirməkdən, ATP-ni ADP-yə hidroliz etməkdən, və bir sıra konformasiya dəyişikliyini həyata keçirmək üçün ADP-ni yeni ATP ilə əvəz etmək xüsusiyyətlərindən istifadə edirlər. Çaperonlar müxtəlif quruluşa malik olan bir neçə sinifə bölünürlər və bunların hamısı zülal bükülməsini müxtəlif yollarla həyata keçirmək üçün ATP birləşdirmək və onu hidroliz etməkdən istifadə edirlər. Bunlara (**1**) hədəf zülalrrın birləşməsini artırmaq və (**2**) özünün konformasiyasnı başqa bir konformasiya keçirmək aiddirlər. ATP-dən asılı olan konformasiya dəyişilməsi (1) substrat büküldükdən sonra bükülmənin optimallaşdırılmasında, (2) başqa molekulların bükülməsinə kömək etmək üçün çaperonun öz əvvəlki vəziyyətinə qatytarılmasında, və (3) yenidən bükülmə üçün lazım olan zamanın ATP hidrolizinin sürətindən asılı olaraq nizamlanmasında istifadə olunur.



ŞƏKİL 3-16. Zülalların bükülməsinin hipotetik yolu. Monomer zülalların bükülməsi quruluş ierarxiyası üzrə ilkin (a)→ikinci (b-d)→üçüncü (e) quruluşlar ardıcıllığı üzrə gedir. Kiçik quruluş motiflərinin formalaşması (c) domenlərin əmələ gəlməsi ilə davam edir (d), və sonda üçüncü quruluş formalaşır (e).

Çaperonların iki əsas ailəsi identifikasiya olunmuşdur:

- **Molekulyar çaperonlar**, zülal substratın qısa seqmentinə birləşir və bükülməmiş və ya qismən bükülmüş zülalları stabilləşdirir, və beləliklə zülalın aqreqasiya olunmasına və deqradasiya uğramasına mane olurlar.
- **Çaperoninlər**, kiçik bükülmə kamerası yaradırlar və onun daxilinə bükülməmiş tam zülal və ya onun hissələri müsadirə oluna bilir, və ona düzgün bükülmək üçün zaman və uyğun şərait və mühit verilir.

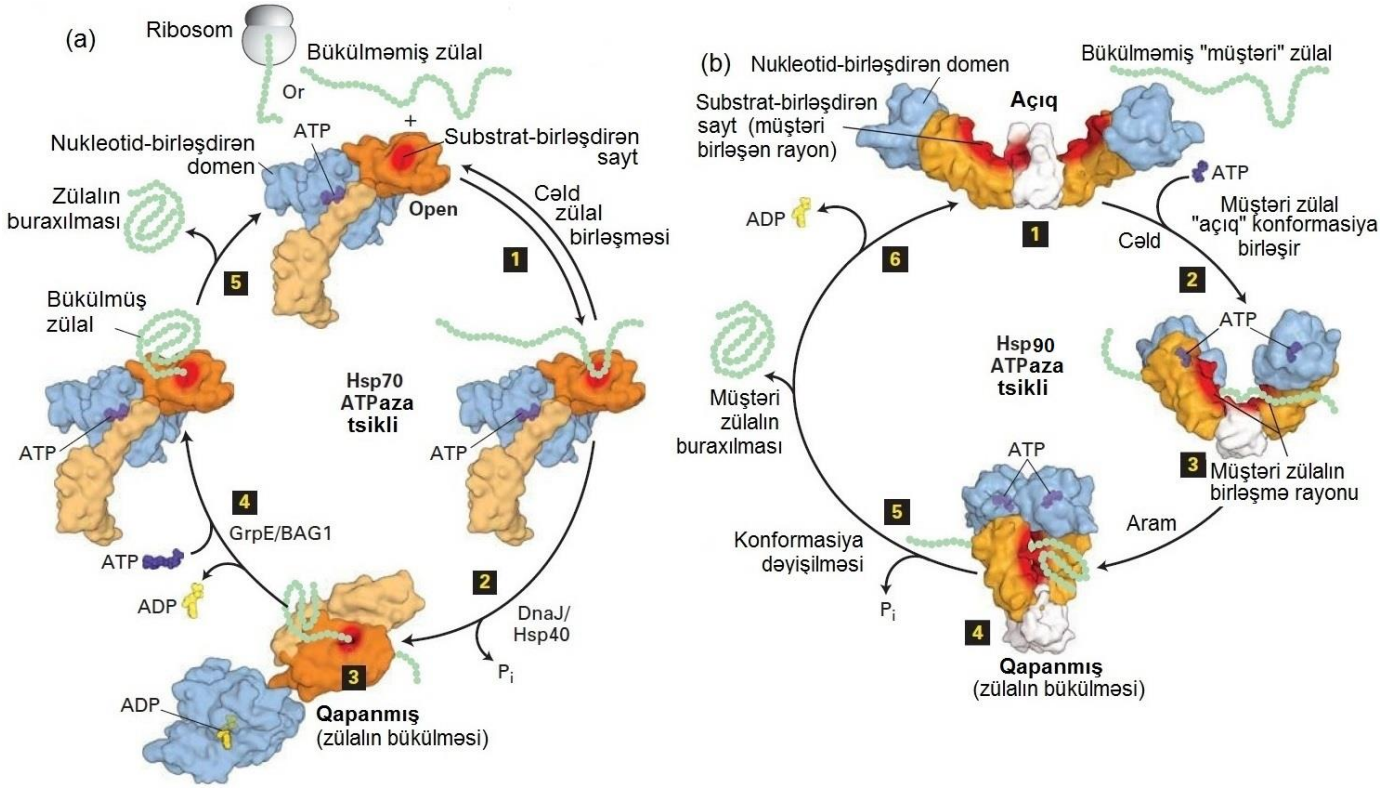
Molekulyar Çaperonlar Hüceyrənin sitozolunda olan istilik-şoku zülalı Hsp70 və onun homoloqları (mitoxondrilərin matrisasında Hsp70, endoplazmatik şəbəkədə BiP və bakteriyalarda DnaK) molekulyar çaperonlardır. Onlar ilk dəfə, hüceyrələrin istilik şoku ilə stresə məruz qaldıqları zaman çox tez meydana gəlmələri ilə identifikasiya olundular (***Hsp*** - "heat shck protein" istilik şoku zülalı mənasını verir). Hsp70 və onun homoloqları bütün orqanizmlərdə olan və öz hədəf zülallarının bükülməsində ATP-dən-asılı olan tsikldən istifadə edən əsas çaperonlardır (Şəkil 3-17a). ATP ilə birləşdikdə, monomer Hsp70 zülalı açıq konformasiyanı alır və onun daxilindəki açıq qalmış hidrofob substrat birləşdirən cib keçici olaraq natamam bükülmüş və ya qismən denaturasiya olunmuş hədəf zülalın açıq qalmış hidrofob rayonu ilə birləşir və sonra ATP birləşmiş vəziyyətdə olduğu müddətdə, o bu substratı tez buraxır (Şəkil 3-17a, pillə 1). Birləşmiş ATP-nin hidroliz olunması molekulyar çaperonun qapalı vəziyyət almasına və nəticədə birləşmiş hədəf zülalın çox möhkəm şəkildə bağlanmasına səbəb olur, belə möhkəm bağlanma substrat zülalın başqa bükülməmiş zülallarla aqreqasiya olunmasının qarşısını alaraq onun düzgün bükülməsi üçün şərait yaradır (Şəkil 3-17a, pillə 2). Sonra çaperona birləşmiş ADP-nin ATP ilə əvəz olunması (pillə 3) nəticəsində çaperonda əmələ gələn konformasiya dəyişilməsi hədəf zülalın buraxılmasına və ATP-birləşmiş "boş" və bükülmək üçün yeni zülala birləşməyə hazır olan (pillə 4) Hsp70 çaperonun yaranmasaına səbəb olur. Əgər hədəf zülal düzgün bükülmüşsə o, yenidən Hsp70 ilə birləşə bilmir. Əgər o, hələ də qismən bükülməmiş vəziyyətdə qalmışsa, yenidən Hsp70 ilə birləşərək düzgün bükülmək üçün yeni imkan qazanacaq. Bu fəsildə bizim sonra görəcəyimiz kimi, müxtəlif zülallar öz fəallıqlarının nəzarət olunması üçün trinukleotidin dinukleotidə hidrolizindən və ardınca da dinukleotid/trinukleotid mübadiləsi tsiklindən istifadə edirlər. Sonra bu fəsildə biz ATP əvəzinə GTP-dən asılı olan, zülalın fəallığına dramatik təsir edən, konformasiya dəyişilməsini induksiya etmək üçün birləşdiyi GDP-ni (ADP əvəzinə) dəyişmək üçün GTP-dən istifadə edən GTP-azalar adlanan zülallar qrupunu müzakirə edəcəyik.

Eukariotlarda ko-çaperon Hsp40 (bakteriyalarda DnaJ) kimi əlavə zülallar, substratın birləşməsi ilə birlikdə ATP-nin hidrolizini Hsp70/DnaK vasitəsi ilə 100-dən 1000 dəfəyə qədər sürətləndirməklə Hsp70-vasitəsi ilə çoxsaylı müxtəlif zülalların bükülməsinin səmərəliliyinin artmasına kömək edir (bax Şəkil 3-17a, pillə 2). Nukleotid dəyişdirən faktorların dörd müxtəlif ailəsinin (bakteriyalarda GrpE, eukariotlarda BAG, HspBP və Hsp110 ailələri) nümayəndələri də Hsp70/DnaK ilə qarşılıqlı əlaqədə olur və ATP-nin ADP ilə əvəz olunmasını sürətləndirir (pillə 3). Guman olunur ki, çoxsaylı molekulyar çaperonlar, yeni sintez olunan bütün polipeptid zəncirlərinə onlar hələ ribosomda sintez olunduğu zaman birləşirlər. Bakteriyalarda zülalların 85 faizi öz çaperonlarından buraxılaraq normal şəkildə bükülməni davam etdirirlər; eukariotlarda daha yüksək faizdə zülallar bu yolla gedirlər.

Hsp70 zülallar ailəsi molekulyar çaperonların yeganə sinifi deyildir. Molekulyar çaperonların başqa, fərqli bir sinifi Hsp90 ailəsidir, bunların nümayəndələri adətən qismən bükülmüş zülalları tanıyır. Təkamülcə qohum olan Hsp90 ailəsinin üzvləri, arxealardan başqa bütün orqanizmlərdə tapılmışdır. Onların təkamulündəki güclü konservativlik *E. coli* bakteriyasında və insandakı Hsp90-ın aminturşu ardıcıllığındakı oxşarlıqdan (55 faiz) görünür. Əksər eukariotlarda dörd müxtəlif Hsp90 mövcuddur, onlardan ikisi sitozoldadır (ümumi zülalların 1-2 faizini təşkil edən Hsp90 ən böyük miqdara malik olan sitozol zülalıdır) digər ikisindən biri endoplazmatik şəbəkədə, biri isə mitoxondridədir. Hərçənd ki, substart zülallarının sayına görə Hsp90 çaperonlar başqa çaperonlar kimi geniş deyildir, (guman olunur ki, maya zülallarının ən azı 10 faizi Hsp90-ın substratıdır) amma Hsp90-lar eukaruotlar üçün həddən artıq vacibdirlər. Hsp90-lar, stress nəticəsində (məsələn istilik stresi ilə) əmələ gələn denaturasiya olunmuş zülalların öhdəsindən gəlməkdə hüceyrəyə kömək edirlər və əmin edirlər ki, onların, adətən "müştəri" adlandırılan bəzi substratları qeyri-fəal vəziyyətdən fəal vəziyyətə keçə bilirlər və ya başqa sözlə funksional konformasiyada olurlar. Bəzi hallarda Hsp90-lar, münasib siqnalın onları dissosasiya edib müştəridən ayırması anına kimi öz müştəriləri ilə çox stabil komplekslər əmələ gətirirlər, müştərini buraxmaqla onlar, hüceyrələrdə bəzi tənzimləyici funksiyaları yerinə yetirirlər. Hsp90-ın müştərilərinə, steroid hormonları estrogen və testosterone reseptorları kimi transkripsiya faktorları daxildirlər. Bu steroid reseptorlar cinsiyyətin inkişafını tənzimləyir və çox genlərin fəallığına nəzarət etməklə (bax Fəsil 9) fəaliyyət göstərirlər. Hsp90-ın başqa tip müştərisi, fosforlaşdırma yolu ilə müxtəlif zülalların fəallığını tənzimləyən kinazalar adlandırılan fermentlərdir (bax Fəsil 15 və 16).

Monomer Hsp70-dən fərqli olaraq Hsp90 ATP-in birləşməsini, onun hidrolizini və ADP-nin buraxılmasını müştərilərin əsas konformasiya dəyişikliyi, birləşdirilməsi, fəallaşdırılması və buraxılması ilə bağlayan tsikldə dimer kimi fəaliyyət göstərir (Şəkil 3-17b). Hərçənd ki, Hsp90-ın mexanizmi barədə hələ çox şeyin öyrənilməmişdir, amma bir şey aydındır ki, müştərilər çaperon "açıq" konformasiyada olarkən (Şəkil 3-17b, pillə 1) substrat-birləşdirən domenə birləşirlər və burada ATP-in birləşməsi ATP-birləşdirən domenlərin qarşılıqlı əlaqəsinə və "qapanmış" konformasiyanın (Şəkil 3-17b, pillə 1 və 2) yaranmasına səbəb olur, ATP-in hidrolizi isə bəzi müştəri zülalların fəallaşmasında və uyğun olaraq onların Hsp90-dan azad olunmasında (pillə 3) əhəmiyyətli rol oynayır. Biz həmçinin bilirik ki, Hsp90-ın fəallığına, o cümlədən ATP-aza fəallığına köklü surətdə təsir edən və ona hansı müştəri zülalın birləşəcəyini (müştəri spesifikliyi) təyin edən, ən azı 20 ko-çaperonlar vardır. Ko-çaperonlar Hsp90 və Hsp70-in fəaliyyətlərinin koordinasiya olunmasına da kömək edirlər. Məsələn, müştərinin bükülməsinin başlamasına Hsp70 kömək edir, sonra ko-çaperonlar tərəfindən alınaraq əlavə prosessing üçün Hsp90-a verilir. Hsp90-ın fəallığına onun kiçik molekullarla əmələ gətirdiyi kovalent modifikasiyalar da təsir edə bilir. Nəhayət, Hsp90-lar, yenidən bükülməsi mümkün olmayan, səhv bükülmüş zülalları tanımaqda hüceyrəyə kömək edir və sonra bu

fəsildə müzakirə olunacaq mexanizmlə onların parçalanmasına şərait yaradır. Beləliklə, hüceyrədə keyfiyyətə-nəzarət sisteminin bir hissəsi kimi çaperonlar zülalların düzgün bükülməsinə kömək edirlər, ya da düzgün bükülməsi mümkün olmayan zülalların parçalanmasına şərait yaradırlar.

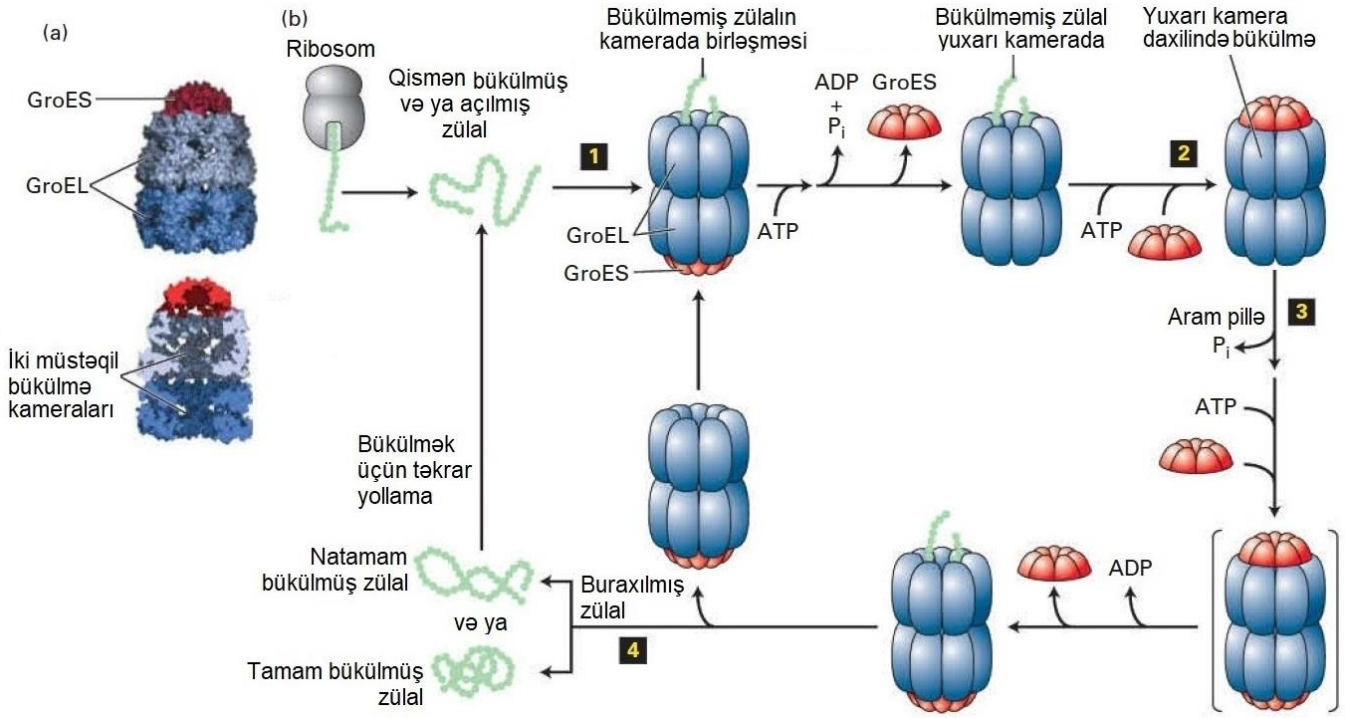


ŞƏKİL 3-17 Zülalların molekulyar çaperonlar vasitəsilə bükülməsi. (a) Hsp70. Çox zülallar, Hsp70 və ya Hsp70-ə-bənzər zülalların köməyi ilə özlərinin düzgün üç-ölçülü quruluşunda bükülürlər. Bu molekulyar çaperonlar keçici olaraq yeni sintez olunmuş polipeptidlər ribosomdan çıxan kimi ona və ya bükülməsi pozulmuş zülallara birləşirlər. Hsp70 tsiklində, ATP Hsb70-in nukleotid-birləşdirici domeninə birləşərkən (açıq mavi) onun substrat-birləşdirici domeninin (açıq və tünd narıncı) açıq konformasiyasında bükülməmiş zülal substrat sürətli tarazlıqla Hsp70-in substart-birləşdirici saytına (qırmızı) birləşir (pillə 1). Substrat-birləşdirici domen, tsikl zamanı mövqeyini və konformasiyasını dəyişən iki subdomendən (açıq və tünd narıncı) ibarətdir. Ko-çaperon köməkçi (aksessor) zülallar (DnaJ/Hsp40) Hsp70-in konformasiya dəyişikliyini induksiya edən ATP-nin ADP-yə (mavi oval) hidrolizini stimullaşdırır və nəticədə qapanmış konformasiya əmələ gəlir və bu zaman, substrat burada substrat-birləşdirici domen içərisində qapanır, burada düzgün bükülmə üçün şərait yaranır (pillə 2 və 3). Başqa ko-çaperon aksessor zülallar (GrpE/BAG1) vasitəsi ilə stimullaşan ATP-nin ADP-yə mübadiləsi Hsp70 molekulunu geriyə açıq konformasiyaya qaytarır (pillə 4), düzgün bükülmüş substart zülalın ayrılmasına səbəb olur (pillə 5) və açıq konformasiyanı regenerasiya edir, o isə yeni bir substratla əlaqəyə girə bilir. (b) Hsp90. Guman olunur ki, dimer Hsp90 molekuluyar çaperonun üç konformasiya vəziyyəti substrat remodelinqində iştirak edir. Müştəri zülal, substrat-birləşdirən (narıncı) və C-sonluq dimerləşmə (ağ) domenlərlə ortaq olan substrat-birləşdirən mərkəzə birləşir (qırmızı səth) və guman olunur ki, ATP birləşməsinə və hidrolizinə cavab olaraq formasını dəyişir. Hsp90 tsikli nukleotid-birləşdirən domenə (açıq mavi) birləşmış nukleotid olmayan halda başlayır və Hsp90 dimeri substratı birləşdirə bilən çox dəyişkən və açıq konfiqurasiyada olur (pillə 1), buna da müştəri birləşə bilir. ATP-nin sürətlə birləşməsi konformasiya dəyişmələrinə səbəb olur (pillə 2), nəticədə nukleotid-birləşən domenlər və substrat-birləşən domenlər birlikdə (intermediat pillə 3-də göstərilir) çox yaxın konformasiya alırlar və burada nukleotid-birləşən domenlər dimerləşirlər (pillə 4). Hsp90-da müştərilərin bağlandığı dəqiq yerlər müxtəlif müştərilər üçün fərqlidir, amma birləşdirici səthlər, o cümlədən substrat birləşdirən domenlərin və C-sonluq dimerləşmə domenlərinin kəsişməsi (qırmızı kölgə ilə vurğulanır) bir sıra müştəriləri birləşdirir. ATP-in hidrolizi Hsp90-ın konformasiya dəyişilməsinə səbəb olur (pillə 5) və buraya müştərinin çox kompakt formada bükülməsi və bükülmüş müştəri zülalın azad olması daxildir. Hsp90-ın ADP birləşmiş forması, yüksək kompakt forma da daxil olmaqla bir neçə konformasiyanı qəbil edə bilir. ADP-in buraxılması (pillə 6), ilkin açıq dəyişkən vəziyyəti regenerasiya edir və o əlavə müştəri zülallarla qarşılıqlı əlaqə yarada bilir. Bax E. D. Kirschke et al., 2014, *Cell* **157**:1685 and M. Taipale, D. F. Jarosz, and S. Lindquist, 2010, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***11**:515. [HSP90-ın həllediciyə-əlçatan səth modeli nəzakətlə Elaine Kirschke and David A. Agard, UCSF tərəfindən. Açıq (ATP) PDB ID 2ior, closed (ATP) PDB ID 2cg9, closed (ADP) PDB ID 2cg9-ə əsaslanər.]

7Çaperoninlər Yeni sintez olunmuş çoxsaylı müxtəlif zülalların düzgün bükülməsi başqa sinif zülalların, Hsp60-lar adlandırılan çaperoninlərin köməyini tələb edir. Bu, çox böyük silindirik zülallar yığını oliqomerlərin iki həlqəsindən formalaşıb. Çaperoninlər, quruluşlarında müəyyən dəyişikliklərə malik olan, molekulyar mexanizmlərinə və yerləşmələrinə görə fərqlənən iki müxtəlif qruplara ayrılır. Qrup I çaperoninlər, prokariotlarda, xloroplastda və mitoxondridə tapılmışdır və iki həlqədən təşkil olunmuşlar, hər bir həlqə isə, homoheptamer ko-çaperon "qapaq"la qarşılıqlı əlqəyə girən yeddi subvahiddən ibarətdir. Bakteriaların GroEL/GroES kimi tanınan I qrup çaperoninləri Şəkil 3-18a-da göstərilmişdir. Guman olunur ki,

E.coli bakteriasında GroEL, bütün zülalların 10 faizinin bükülməsində iştirak edir. Eukariot hüceyrələrin sitozolunda və arxealarda tapılan Qrup II çaperoninlərin (məməlilərdə bu TriC) hər bir həlqəsi səkkiz və ya doqquz homomer və ya hetereomer subvahidlərdən təşkil olunublar və "qapaq" funksiyası bu subvahidlərin özündə birləşmiş vəziyyətdə olur - ayrıca qapağa isə ehtiyac olmur. Belə məlum olub ki, ATP-in hidrolizi qurup II çaperoninlərdə qapağın örtülməsini işə salır.

Şəkil 3-18b, zülalların bükülməsinin GroEL/GroES dövrəsini təsvir edir. Qismən bükülmüş və ya səhv bükülmüş, 60 kD-dan kiçik çəkidə olan polipeptid GroEL kameranın girişinə yaxın yerdə hidrofob qalıqlar tərəfindən tutulur və bükülmə kamerasının birinə daxil olur (Şəkil 3-18b, yxarı kamera). İkinci kamera GroES qapaqla qapanmışdır. GroEL-in 14 subvahidinin hır biri ATP-ni özünə birləşdirə, onu hidroliz edə və uyğun olaraq ADP-ni azad edə bilir. Bu reaksiyalar, bir halqada olan yeddi subvahidin hər bir dəsti üçün aparılır və əsas konformasiya dəyişikliyinə səbəb olur. Bu dəyişikliklər həm kameranı qapayan GroES qapağın birləşməsinə, həm də polipeptidn bükülməsinin baş verdiyi kamera daxilindəki mühitə nəzarət edir. Polipeptid, qapaqla örtülmüş kamerada yerləşmiş vəziyyətdə qalır. O, kamerada dövrədəki ən yavaş və məhdudlaşdırıcı pillə ($t_{1/2}$~10s) olan ATP hidrolizinin ATP-nin və digər GroES-in başqa bir halqaya birləşməsini induksiya etməsinə qədər müddətdə bükülməyə məruz vəziyyətdə qalır. Bu, sonra GroES qapağın və içərisində-peptid olan halqaya birləşmiş ADP-in buraxılmasına, kameranın açılmasına səbəb olur, və bükülmüş zülalın kameradan diffuziya edərək çıxmasına imkan yaradır. Əgər, polipeptid düzgün bükülmüşsə o hüceyrədə öz funksiyasını yerinə yetirməyə gedə bilər. Əgər o, hələ də qismən bükülübsə və ya səhv bükülübsə, yenidən tutulmamış (sərbəst) GroEL-ə birləşə bilir və bütün dövrə yenidən təkrar olunur. GroEL kompleksində iki halqa arasında qarşılıqlı əlaqələr vardır. Kamerada tutulmuş substratın bükülməsinə imkan vermək üçün həmin kameranın GroES ilə qapanması, substrat polipeptidin ikinci halqanın kamerasından azad olması ilə müşayət olunur (eyni zamanda birləşmək, bükülmək, və ikinci kameradan buraxılmaq Şəkil 3-18b-də təsvir olunmamışdır). Zülalların bükülmək üçün tutulduğu GroEL/GroES qapalı-çəllək dizaynı (forması) ilə zülal deqradasiyasında iştirak edən 26S proteasomun quruluşu arasında çox güclü (heyrətləndirici dərəcədə) oxşarlıq vardır (Bölmə 3.4-də müzakirə olunur). Bundan əlavə, AAA^+ ailəsinə daxil olan ATPzaların bir hissəsi olan zülallar qrupu, mərkəzində deşik olan heksamer halqalardan təşkil olunmuşdur, substrat bükülmək və ya açılmaq üçün və bəzi hallarda proteoliz olunmaq üçün mərkəzi deşiyin içərisindən keçirlər: bunların detalları Fəsil 13-də müzakirə olunacaq.



ŞƏKIL 3-18 Çaperoninlər vasitəsi ilə zülalların bükülməsi. Bəzi zülalların düzgün bükülməsi, məsələn prokariotlardakı qrup I çaperonin GroEL kimi çaperoninlərdən asılıdır. (a) GroEL, 14 eyni (identik) ~60000-MÇ subvahidlərdən ibarət olan, hər biri yeddi subvahiddən təşkil olunmuş və iki müxtəlif daxili polipeptid bükülmə kamerasını yaradan, iki sıra vertikal yerləşmiş halqalarda (mavi və qırmızı) düzülmüş çəllək-şəkilli kompleksidir. Homoheptamer (10000-MÇ subvahidlər) qapaqlar, GroES (sarı) çəlləyin hər iki tərəfinə birləşə bilir və kameranı həmin tərəfdə qapayaraq tıxayır. (b) GroEL-GroES bükülmə tsikli. Qismən bükülmüş və ya səhv bükülmüş polipeptid bükülmə kameralarının birinə daxil olur (pillə 1). İkinci kamera isə GroES qapağı ilə blok olunur. Yeddi GroEL subvahidin yaratdığı hər bir halqa, GroES birləşməsi və buraxılması və polipeptid birləşməsi, bükülməsi və buraxılması ilə koordinasiya olunan ardıcıllıqda yeddi ATP birləşdirir, onları hidroliz edir və ADP-ləri buraxır. GroEL halqalarda baş verən əsas konformasiya dəyişilmələri, kameranı qapayan GroES qapaqların birləşməsinə nəzarət edir (pillə 2). Polipeptid, qapaqla örtülmüş kamerada yerləşdirilmiş vəziyyətdə qalır, burada, ATP hidroliz olunana qədər müddətdə onun bükülməsi gedir, bu tsikldə ən zəif, məhdudlaşdırıcı pillə ($t_{1/2}$~10s) (pillə 3)

ATP-in və başqa GroES-in başqa bir halqaya birləşməsini induksiya edir (müvəqqəti vasitəçilər mötərəzədə göstərilmişdir). Bu, sonra GroES qapağın və içərisində peptid olan halqaya birləşmiş ADP-in buraxılmasına, kameranın açılmasına səbəb olur, və bükülmüş zülalın kameradan diffuziya edərək çıxmasına imkan yaradır (pillə 4). Əgər, polipeptid düzgün bükülmüşsə o hüceyrədə öz funksiyasını yerinə yetirməyə gedə bilər. Əgər o, hələ də tam bükülməyibsə və ya səhv bükülübsə o, yenidən tutulmamış GroEL-ə birləşə bilir və bütün tsikl təkrar olunur. Bax D.L. Nelson and M.M. Cox, 2013, *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 6th ed. Macmillan. [(a) hissə verilənləri Z. Xu, A. L. Horwich, and P. B. Siegler, 1997, *Nature* **388**:741–750, PDB ID 1aon-dən.]

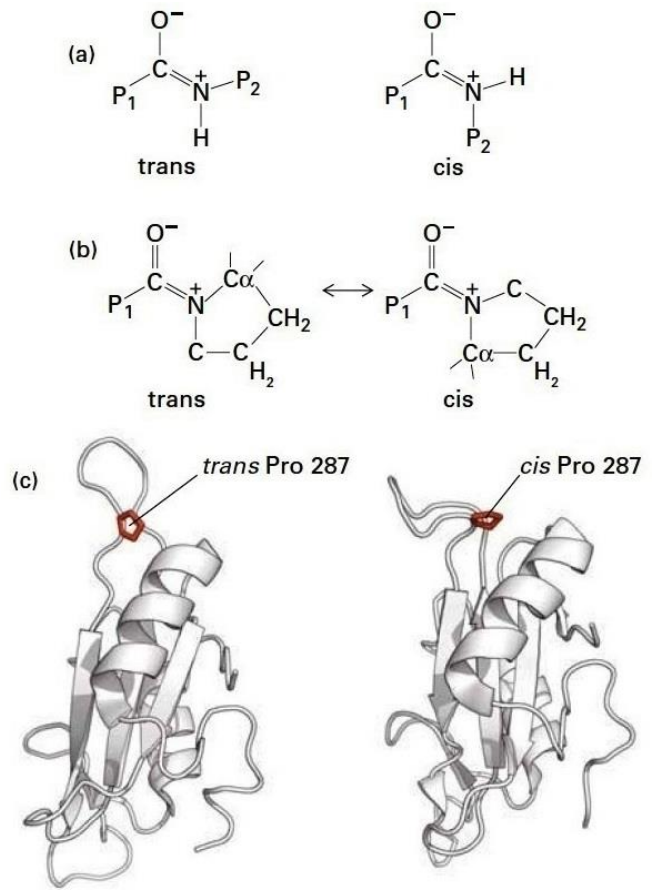
Zülal Bükülməsi Prolin İzomeraza ilə Təşviq Olunur

Bizim əvvəldə öyrəndiyimiz kimi, polipeptid zəncirin peptid rabitəsinin hər iki tərəfindəki (P_1 və P_2) hissəsi demək olar ki, həmişə trans konfiqurasiyada yönəlmişdir (Şəkil 3-19a). Amma, P_2 nahiyəsində prolin olarkən, cis konfiqurasiya ilə müqayisədə trans konfiqurasaiya (Şəkil 3-19a) energetik cəhətdən daha güclü üstünlüyə malik olmur. Quruluşu təyin edilmiş bükülmüş zülallar arasında P2-də prolin olmadan bütün digər peptid əlaqələrinin 0,03 faizi ilə müqayisədə P_2 vəziyyətində prolin olan peptid əlaqələrinin təxminən 5 faizi ***cis*** konfiqurasiyasını nümayiş etdirir. *Cis* və *trans* konfiqurasiyalar arasında izomerləşmə sürəti nisbətən aşağı olduğundan hüceyrələr düzgün izomerli bükülməni həyata keçirərkən cis/trans izomerləşməni kataliz etmək üçün prolin izomeraza zülallarından istifadə edirlər. Guman olunur ki, konformasiyanı dəyişmək və beləliklə də artıq stabil bükülmüş zülalların fəalığını dəyişmək üçün prolil izomerləşmə keçirici rolunu oynayır. Həqiqətən də, belə izomerləşmələr bəzi zülallarən quruluşunu əhəmiyyətli dərəcədə dəyişdirə bilir (Şəkil 3-19c).

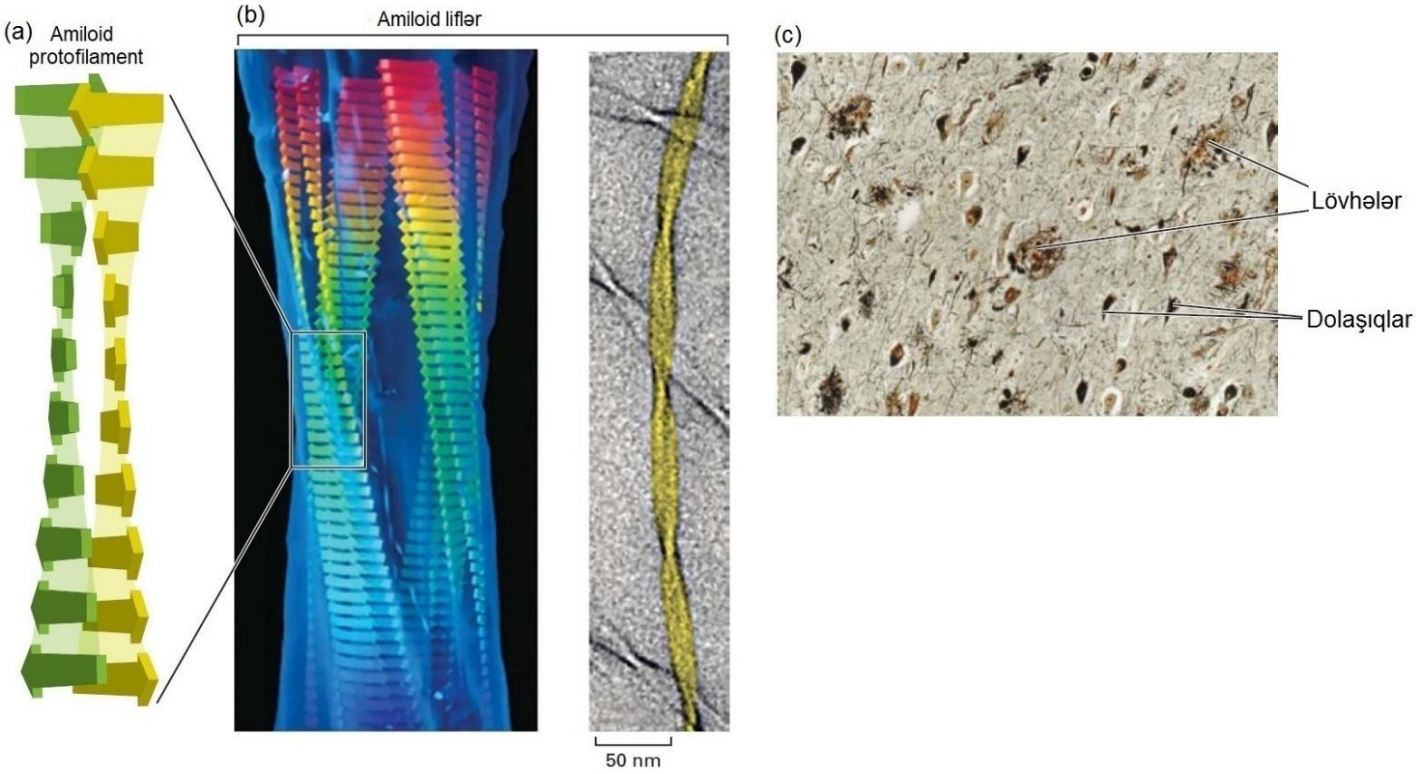
Anormal Bükülmüş Zülallar Xəstəliklərin yaranmasında İşrirak Edirlər

Son zamanların dəlilləri göstərir ki, mutasiyalar və zülalların sintezindən sonra onlarda əmələ gələn lazımsız kovalent modifikasiyalar, və yaxud ətraf mühitin kimyəvi (məsələn, pH) və ya fiziki (məsələn, istilik) dəyişilmələri nəticəsində zülallar alternativ üç-ölçülü quruluşda bükülə bilirlər. Bu cürə "səhv-bükülmə" zülalın normal funksiyasının itirilməsinə səbəb olur, beləliklə də o, sonra bu fəsildə təsvir edildiyi kimi, çox hallarda proteolitik parçalanmaya uğramaq üçün işarələnirlər. Amma, parçalanma tam baş vermədikdə və ya səhv bükülmənin çoxsaylı nüsxələri ilə bacarmayanda səhv bükülmüş zülalların və ya onların proteolitik fraqmentlərinin müvafiq toplanması həll-olmayan, bir-birinə sarılmış zülalların qatmaqarışıq aqreqatlarının meydana gəlməsi ilə və ya müxtəlif orqanlarda, o cümlədən qaraciyərdə, sümüklər arasındakı oynaqlarda və beyində plaq (lövhə) kimi xarakterizə olunan bəzi degenerativ xəstəliklərin yaranmasına gətirib çıxarır. Hətta, normal halda aqreqasiyaya yüksək dərəcədə davamlı olan bü zülallar və ya bu zülal fraqmentləri, daxilən nizamsız zülallar və ya zülal fraqmentlərində olduğu kimi, qatılıqları kifayət qədər yüksək olanda və ya ətraf mühitlərində dəyişiklik baş verəndə aqreqatları əmələ gətirəcəklər. Yuxarıda qeyd olunduğu kimi, belə aqreqatlar ya amorf olurlar ya da yaxşı nizamlanmış quruluşda, yaxşı məlum olan *amiloid vəziyyətində* olurlar. Təccübləndirici dərəcədə, geniş müxtəliflikdə zülalların hər biri ümumi quruluşa malik olan və çarpaz-β vərəqlər adlandırılan amiloid liflərdə aqreqasiya oluna bilirlər (Şəkil 3-20a). Əsasən 6-12 qalıqdan ibarət olan qısa seqmentlər, bir-birinə hidrogen rabitələri ilə bağlanmış bükülməmiş və ya səhv bükülmüş zülallar β-vərəqlərin uzun düzümünü və ya filamentini yaradırlar. Bu düzümlərdə hər bir β zəncir filamentin uzun özülünə təxminən perpendikulyardır və iki uzun, təxminən yastı (müstəvi) olan β vərəqlər sıx şəkildə bir yerə bükülərək bir-birinin ətrafında sarınaraq protofilamenti əmələ gətirir və sonra da *amiloid lifləri* (*fibrilləri*) adlanan qalın filamentlərdə bir yerə toplanırlar. Hər bir protofilament daxilində ***β zəncirlər ya parallel ya da qeyri parallel ola bilirlər*** (Bax Şəkil 3-5). Baxmayaraq ki, bəzi zülallar öz nativ funksional vəziyyətlərində amiloid lifləri əmələ gətirirlər, amma amiloidlərin əksəriyyəti zülalların səhv bükülməsinin nəticələridir.

Amiloidlər ilk dəfə toxumalarda toplanmış zülal aqreqatlarında tapılmışdır, fermentativ parçalanmaya davamlıdırlar, amiloidlər adlanan onlarla xəstəliklərlə bağlıdırlar. Bu xəstəliklərə neyrodegenerativ xəstəliklər, o cümlədən insanlarda Alzheymar xəstəliyi və Parkinson xəstəlikləri, inəklərdə və qoyunlarda yayıla bilən spongiform ensefalopat xəstəliyi ("mad cow" xəstəliyi) daxildirlər. Bu xəstəliklərin hər biri üçün pisləşmiş beyində dolaşıq liflərdən ibarət olan lövhəşəkilli nişanların formalaşması xarakterikdir (Şəkil 3-20b). Amiloidosis əsasən yaşla əlaqədar olaraq baş verir, amma, aqreqasiya edən zülalı kodlaşdıran gendə baş verən mutasiya erkən amiloid yaranmasına və xəstəliyin inkişafına səbəb olur. Lövhələri təşkil edən amiloid liflər zəngin təbii zülallardan törəyir. Məsələn, amiloid səlef zülalın plazma membranına batmış fraqmentləri Alzeymer xəstələrin beynində tapılmış lövhələri (plaque) əmələ gətirirlər, yoluxma zülalı prion isə prion xəstəliyi zamanı lifləri əmələ gətirir. Alzeymer xəstəliyində, normal halda mikroborucuq-birləşdirən tau zülalının hiperfosforlaşmış forması (bax Fəsil 18) "dolaşmış kələf" ("tangles") adlanan burulmuş lifləri əmələ gətirir. Amiloidlər ya nisbətən qısa, suda həllola-bilən protofilamentlər, ya da çox uzun həllola-bilməyən liflər şəkilində olur, guman edilir ki, zəhərlidirlər (toksik) və patoloji amiloidozanın yaranmasına səbəb olurlar.



ŞƏKİL 3-19 Prolin cis/trans izomerləşmə zülallarən bükülməsinə və quruluşuna təsir edir. (a) Peptid əlaqələrinin müstəvidə ikiqat rabitələrə-oxşar xarakteri polipeptid zəncirin hər iki (P_1 və P_2) tərəfində hissələrin cis və trans konfiqurasiyalarının olmasına səbəb olur. Trans konfiqurasiya yaxşı orientasiya olunmuş zülallarda P_2 vəziyyətində prolindən başqa istənilən amin turşu qalığı olan bütün peptid əlaqələrinin təxminən 99.97 faizini təşkil edir. (b) P_2 prolin olanda, peptid əlaqələrin təxminən 5 faizi cis konfiqurasiyada olur. Zülalın bükülməsini asanlaşdırmaq üçün prolin izomerazalar cis/trans izomerləşməni kataliz edirlər. (c) Burada zülalın hissəsinin quruluşu, SH2 zülal domeni (bax Fəsil 16), tək bir prolinin cis/trans izomerləşməsi yolu ilə dramatik şəkildə dəyişilə bilər və beləliklə də zülallın fəallığına təsir edilir. [(c) hissəsində trans verilənlər E. V. Pletneva et al., 2006, *J. Mol. Biol.* **357**:550-561, PDB ID 2etz-dən. (c) hissəsində cis verilənlər R. J. Mallis et al., 2002, *Nat. Struct. Biol.* **9**:900–905. *PDB ID* 1lui-dən.]



ŞƏKİL 3-20 Səhv bükülmüş zülallar çarpazlaşan β vərəq quruluşa əsaslanan nizamlanmış amiloid aqreqatlarını yarada bilir. (a) Zülalların və polipeptidlərin bükülməmiş seqmentlərində 6-12 qalıq uzunluqda açıq qalmış seqmentləri (qısa yastı oxlar) β-vərəqlərdə toplana bilirlər (Şəkil 5-3-ə də bax), bu zaman hər bir β zəncir amiloid protofilamentin uzun özülünə təxminən perpendikulyar (şəkildə şaquli)

uzanır və aşağıdan və yuxarıdan zəncirə hidrogen rabitəsi ilə (açıq kölgə) bağlanır. İki uzun, təxminən yastı vərəqlər sıx şəkildə bir yerə bükülür və bir-birinə dolanaraq amiloid protofilamenti əmələ gətirirlər, onlar isə sonra bir yerə toplanaraq qalın amiloid lifləri yaradırlar. (b) Amiloid liflər müxtəlif sayda protofilametlərdən ibarət ola bilərlər. Dörd-protofilament-tərkibli lifin modeli turşu ilə denaturasiya olunmuş insulin liflərinin elektron sıxlığına (solda) və NMR-a əsaslanan model (sarı) ilə transtiretin fraqmentlərinin iki protofilamentə malik olan liflərinin krioelektron mikroskopiya təsvirinə uyğundur. Fibrillər, toxmalarda yığılan mikroskopik plaqlarda (lvhələrdə) dolaşıq kələflərdə toplana bilirlər, rənglənərkən işıq mikroskopunda görünə biləcək dərəcədə böyük olurlar. (c) Alzeymar xəstəliyinə tutylmuş insanın beyin toxuması kəsiyinin bir sıra amiloid plaqları və lifli kələflərlə mikroskopik grünüşü. [(b, *solda*) hissəsi Elsevier razılığı ilə Dobson, C.M., " Protein misfolding, evolution and disease," *Trends in Biochemical Science* 1999, **24**(9):329-332. Fig. 3-dən yenidən çap olunur. (b, *sağda*) hissəsi Macmillan Publishers Ltd: razılığı ilə Knowles et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014, **15**(6):384-396. Fig. 3a-dən yenidən çap olunur. (c) hissəsi Thomas Deerinck, NCMIR/Science Source.]

3.2 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSIYALARI

Zülalların Bükülməsi

- Zülalların birinci quruluşu (aminturşu ardıcıllığı) onun funksiyasını müəyyən edən üç-ölçülü quruluşunu təyin edir. Qısaca olaraq, funksiya quruluşdam doğur; quruluş ardıcıllıqdan doğur.
- Zülalın funksiyası onun quruluşundan törəndiyindən, yeni sintez olunmuş zülallar düzgün formada bükülməlidirlər ki, düzgün funksiyaya malik olsunlar.
- Peptid əlaqələrinin planar (müstəvi) quruluşu polipeptidin ala biləcəyi konfiqurasiyanın sayını məhdudlaşdırır (bax Şəkil 3-15).
- Zülalın aminturşu ardıcıllığı onun xüsusi üç-ölçülü konformasiyaya – nativ quruluşa bükülməsini müəyyən edir. Zülallara, onların üç-ölçülü qururluşlarını stabilləşdirən qeyri kovalent qarşılıqlı əlaqələri qıran şəraitlə təsir etdikdə onların bükülməsi açılacaq və ya denaturasiya olunacaq.
- Düzgün bükülməmiş və ya denaturasiya olunmuş zülallarda görünən qeyri-nativ konformasiyanın iki geniş yayılmış sinifi vardır: (1) monomer bükülməmiş və ya denaturasiya olunmuş quruluş; (2) aqreqatlar, bunlar ya amorf olurlar, ya da yaxşı nizamlanmamış quruluşda olurlar.
- Zülalların in vivo bükülməsi ATP-dən asılı olan çaperonların köməyi ilə baş verir. Çaperonlar zülallara bir neçə yolla, o cümlədən səhv bükülmənin və aqreqasiyanın qarşısını almaqla, düzgün bükülmə üçün şəraiti yaratmaqla və zülalların müvafiq fəallığının təmin olunması üçün tələb olunan müvafiq stabil quruluşun qorunub saxlanması yolu ilə təsir edə bilirlər (bax Şəkil 3-17).
- Çaperonların iki geniş yayılmış sinifi vardır: (1) molekulyar çaperonlar, hansı ki, substrat zülalın qısa seqmentinə birləşirlər, və (2) çaperoninlər, bunlar bükülmə kamerasını yaradırlar və onun daxilinə tam bükülməmiş zülal bütövlükdə və ya onun hissələri "müsadirə" oluna bilir və ona düzgün bükülmək üçün zaman və uyğun olan mühüt verilir. İstehsal olunmuş ADP-nin yeni ATP molekulu ilə əvəz olunması ilə davam edən ATP birləşməsi və hidrolizi dövrələri çaperonlarla zülal bükülməsi mexanizmində həlledici rol oynayır.
- Səhv bükülmüş və ya denaturasiya olunmuş çox zülallar, amiloid liflər (fibrillər) adlanan, çarpaz-β-quruluş adlanan fibril oxuna təxminən perpendikulyar olan, β vərəqlərin uzun düzülüşünü əmələ gətirən polipeptidlərin qısa uzanmalarından əmələ gələn yaxşı təşkil olunmuş aqreqatları yarada bilirlər. Müxtəlif fermentlər tərəfindən parçalanmaya davamlı olan amiloid fibrillərin yaranması amiloidoza adlanan onlarla müxtəlif xəstəliklərlə əlaqəlidirlər. Bunlara Alzeymer və Parkinson xəstəlikləri kimi bəzi neyrodegenrativ xəstəliklər aiddirlər.

3.3 Zülalların birləşməsi və fermentativ kataliz

Zülallar həm hüceyrə daxilində, həm də hüceyrə xaricində son dərəcə geniş müxtəliflikdə fəalliyyətləri yerinə yetirirlər, belə ki, bu müxtəlif funksiyaların çoxu zülalların ümumi fəaliyyətinə, birləşdirmə fəaliyyətinə əsaslanır. Zülallar özləri bir-birinə birləşir, başqa makromolekullara birləşir, kiçik molekullara birləşir, və ionlara birləşirlər. Bu bölmədə, biz zülalların birləşmələrinin bəzi əsas xüsusiyyətlərini təsvir edəcəyik, sonra isə bu zülal qruplarından birinin, fermentlərin daha dərin detallarına baxacağıq. Zülalların başqa funksional qruplarının (quruluş, skafold, nəqliyyat, tənzimləyici və motor) fəaliyyətləri sonrakı fəsillərdə müzakirə olunacaq.

Liqandların Xüsusi Birləşməsi Zülalların Çoxunun Funksiyasının Əsasıdır

Zülalın birləşdiyi molekul liqand adlanır. Bəzi hallarda liqandın birləşməsi zülalda forma dəyişilməsinə səbəb olur. Belə konformasiya dəyişilmələri çox zülalların təsir mexanizminə inteqral olur və zülalın fəallığının tənzimlənməsində əhəmiyyət kəsb edir.

Zülalın iki xüsusiyyəti onun liqanda necə birləşməsini xarakterizə edir. ***Spesifiklik*** zülalın bir molekula və ya kiçik molekullar qrupuna başqa molekullarla müqayisədəüstünlüklə birləşmək qabliyyətidir. A***ffinlik*** (***uyğunluq***) zülalın liqanda daha sıx və möhkəm birləşmək qabliyyətidir, adətən dissosasiya konstantı ilə ifadə olunur (K_d). Zülal-liqand kompleksləri üçün K_d, birləşmə reaksiyalarında tarazlıq konstantının (K_{eq}) əksidir və affinliyin ölçüsünü ifadə edən əsas kəmiyyət göstəricisidir (bax Fəsil 2). Zülal və liqand arasında qarşılıqlı əlaqə nə qədər möhkəm olarsa K_d qoiyməti o qədər aşağı olur. Zülalların liqandlara qarşı həm spesifikliyi həm də affinliyi zülalda *liqand-birləşdirən mərkəzin (saytın)* quruluşundan asılıdır. Yüksək-affinliyin və yüksək spesifik qarşılıqlı əlaqənin baş tutması üçün birləşdirmə saytının forması və kimyəvi xassəsi liqand molekulunun eyni parametrlərinə komplementar olmalıdır və bu xüsusiyyət **molekulyar komplementarlıq** adlanır. Fəsil 2-də gördüyümüz kimi molekulyar komplementarlıq molekullara imkan verir ki, çoxsaylı qeyri kovalent əlaqələri yaratsınlar, bir-birinə daha çox yaxınlaşa bilsinlər və nəhayət bir-birinə yapışmış vəziyyətdə olsunlar.

Zülal-liqand birləşməsinə aid yaxşı öyrənilmiş misallardan biri, yüksək affinlik və güclü spesifikliyə malik olan **anticismlərin antigenlərə** birləşməsidir. Anticismlər qanda dövrə edən zülallar olub, adətən makromolekullar kimi yoluxdurucu orqanizmlər (bakteriya və ya virus), və ya başqa yad maddələr kimi (zülallar və ya tozcuqlardakı polisaxaridlər) antigenlərə cavab olaraq immun sistemi tərəfindən istehsal olunurlar (bax Fəsil 23). Müxtəlif antigenlərin təsirinə cavab olaraq müxtılif anticismlər istehsal edilir və bu anticismlərin antigenin **epitop** adlanan müəyyən hissəsinə nəzərə çarpacaq dərəcədə yüksək birləşmə xüsusiyyəti ("tanımaq") vardır və bu xüsusiyyət ilkin olaraq anticism yaradılarkən onda antigenə qarşı induksiya olunur, amma başqa molekullara olmur. Anticismlər antigenlərə qarşı spesifik sensor kimi fəaliyyət göstərirlər, onlar anticism-antigen kompleksini yaratmaqla hüceyrənin immun sistemində müdafiə reaksiyaları kaskadını yaradırlar. Fəsil 23-də anticismlər və onların immun sistemində rolu müzakirə olunur və bu fəsilin sonrakı hissələrində biz anticismləri istismar edən zülalların öyrənilməsində istifadə olunan metodları müzakirə edəcəyik. Burada biz anticismlərin quruluşunu və onların epitopa birləşməsini qısaca təsvir edirik.

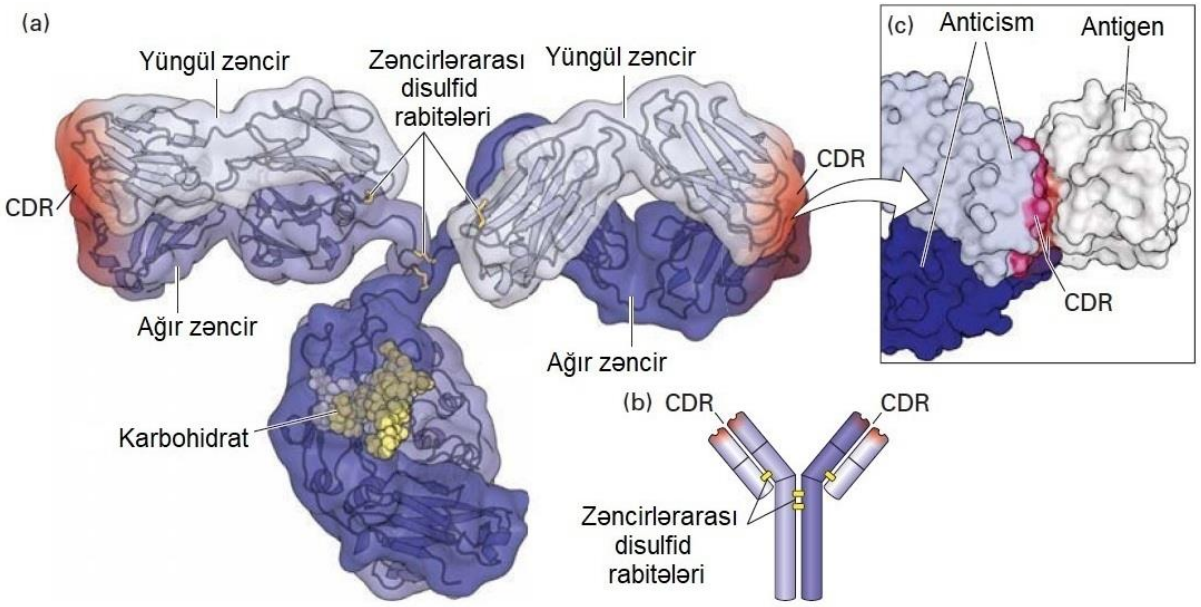
Bütün anticismlər Y formasında molekullar olub iki eyni uzun, və ya *ağır* zəncirdən və iki eyni qısa və ya *yüngül* zəncirdən təşkil olunublar. IgG anticismlərdə (həmçinin immunoqlobulinlər adlanırlar, Şəkil 3-21a-da gstərilir) hər bir ağır zəncirdə dörd qlobulyar domen və hər bir yüngül zəncirdə iki qlobulyar domen vardır, bunlar hamısı birlikdə immunoqlobulin (IgG) domenlər adlanır. IgG anticism molekulunun iki şaxələnmiş dirsəyində ağır zəncirə disulfid əlaqələrlə birləşmiş bir yüngül zəncir vardır, iki disuldid əlaqələri isə ağır zəncirləri biryerə kovalent birləşdirir. Hər bir dirsəyin, ucuna yaxın, *komplementarlığı-təyin edən rayon* (*CDRs*) adlanan və antigen birləşmə saytlarını əmələ gətirən altı yüksək dərəcədə dəyişkən ilgək vardır. Anticismlər arasında altı ilgəyin ardıcıllığı yüksək dərəcədə dəyişkəndir və unikal komplementar liqand-birləşdirən saytların əmələ gəlməsi onları müxtəlif epitoplar üçün spesifik edir (Şəkil 3-21a). Anticismlə epitop səthlər arasında çoxsaylı qeyri kovalent qarşılıqlı təsirlə stabilləşən yaxın əlaqə (kontakt), anticism tərəfindən göstərilən çox dəqiq birləşmə spesifikliyini təmin edir.

Anticismlərin spesifikliyi o qədər dəqiqdir ki, onlar hətta bir növ daxilində fərdlərdə olan hüceyrələri də bir-birindən fərqləndirir, bəzi hallarda isə hətta yalnız bir amin turşusu ilə fərqlənən zülalları da fərqləndirə bilir və ya eyni ardıcıllığa malik olan zülalın fərqli post-translyasiya modifikasiyalarını belə fərqləndirir. Onların yüksək spesifikliyunə görə və asanlıqla istehsal olunmalarına görə (bax Fəsil 23), anticismlər, növbəti fəsillərdə müzakirə olunmuş müxtəlif təcrübələrdə çox istifadə olunan sərfəli reagentlərdir.

Biz bu kitab boyunca, zülal-liqand birləşmsi barədə, o cümlədən hormonların reseptorlara birləşməsi (bax Fəsil 15), tənzimləyici zülalların DNT ilə birləşməsi (bax Fəsil 9), hüceyrə-adgeziya molekullarının hüceyrəxarici matrisaya birləşməsi (bax Fəsil 20) də daxil olmaqla çoxsaylı misallarla rastlaşacağıq. Biz burada diqqətimizi, yalnız bir sinif zülalların necə birləşməsinə, hüceyrənin yaşaması və fəaliyyəti üçün çox vacib olan kimyəvi reaksiyaların katalizi ilə nəticələnən, fermentlərin öz liqandlarına necə birləşməsinin öyrənilməsinə yönəldəcəyik.

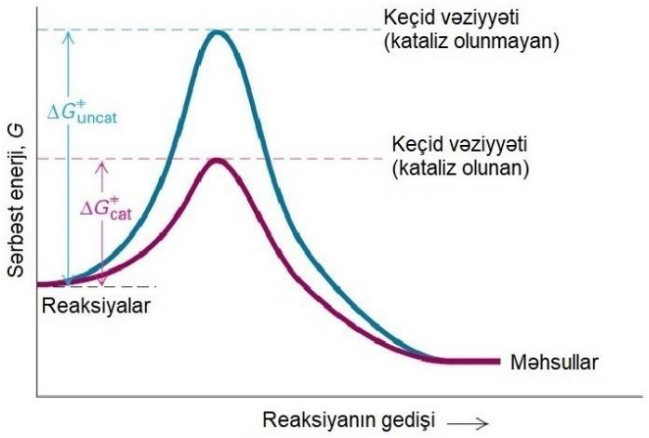
Fermentlər Olduqca Səmərəli Katalizatorlardır

Kovalent rabitələrin qırılması və ya onların yaradılması kimi kimyəvi reaksiyaları kataliz edın zülallar **fermentlər** adlanır, fermentlərin liqandları isə **substratlar** adlanır. Fermentlər zülalların çox əhəmiyyətli olan ən böyük sinifini təşkil edirlər - həqiqətən də, demək olar ki, hüceyrədə baş verən bütün kimyəvi reaksiyalar xüsusi katalizatorlarla, adətən fermentlərlə kataliz olunurlar. Hüceyrədə digər katalitik xüsusiyyətə malik olan makromolekul RNT-dir. Bu RNTlər **ribozimlər** adlanır (bax Fəsil 5).



ŞƏKİL 3-21 Anticismlərdə zülal-liqand birləşmələri. (a) Anticismin hibrid (səth və lent) modeli. İmmunoqlobulin G (IgG) sinifinin hər bir anticism molekulu bir-biri ilə disulfid kovalent rabitə ilə (sarı) əlaqədə olan iki eyni ağır zəncirdən (orta və tünd göy) və iki eyni yüngül zəncirdən (açıq mavi) təşkil olunumuşdur. Antigen birləşmə saytrını müəyyən edən komplementarlığı təyin edən rayonlar

(CDR) qırmızı kölgə ilə qeyd edilmişdir. (b) Cizgi iki ağır (daha uzun) və iki yüngül (daha qısa) zəncirə malik olan ümumi quruluşu göstərir, sarı barlar disulfid əlaqələri bildirir. (c) Əlcək-içində-əl anticismlə onun hədəf antigendə birləşdiyi sayta (epitop), indiki halda toyuq yumurtasının lizosiminə affinliyidir. İki molekul arasında əlaqənin baş verdiyi rayon səthdə göstərilmişdir. Anticism antigen ilə komplementar-təyinedici rayonların (CDRs) qalıqları ilə əlaqədə olur. [(a) hissədə verilənlər J. Harris, et al., 1997, *Biochemistry* **36**:1581-1597, PDB ID 1igt. (b) hissədə verilənlər E. A. Padlan et al., 1989, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:5938–5942, PDB ID 3hfm.]



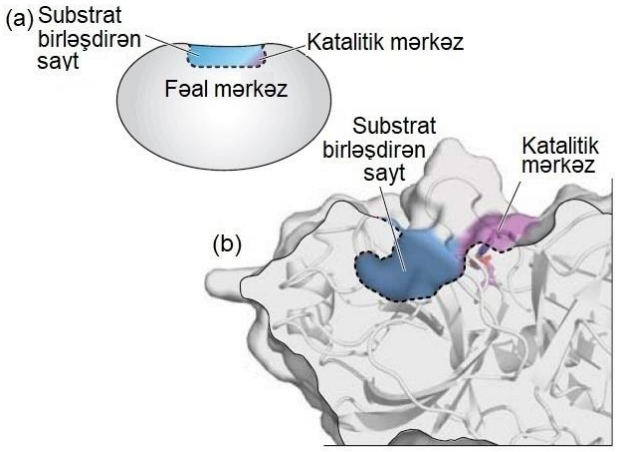
ŞƏKİL 3-22 Kimyəvi reaksiyaların fəallaşma enerjisinə fermentlərin təsiri. Bu hipotetik reaksiya yolu reaksiyanın gedişində sərbəst enerji dəyişməsi G-ni təsvir edir. Əgər reaksiya məhsullarının ümumi G enerjisi reaksiyaya girən reagentlərin enerjisindən az olarsa (mənfi ΔG) o zaman reaksiya kortəbii şəkildə (spontan) gedəcək. Amma, bütün kimyəvi reaksiyalar bir və ya daha artır yüksək enerjili keçid vəziyyəti ilə davam edir və reaksiyanın sürəti fəallaşma enerjisi ($\Delta G^{\ddagger}$) ilə tərs mütənasib olur, bu fəallaşma enerjisi reaksiyaya girənlərlə keçid vəziyyəti arasındakı sərbəst enerji (reaksiya yolu boyu ən yüksək nöqtə) fərqidir. Fermentlər və başqa katalizatorlar keçid vəziyyətində sərbəst enerjini, $\Delta G^{\ddagger}$ azaltmaqla reaksiyanın sürətini artırırlar.

Hər biri tək bir reaksiyanı və ya bir-birinə yaxın olan reaksiyalar dəstini kataliz edən minlərlə müxtəlif tip fermentlər aşkar edilərək dentifikasiya olunmuşdur. Bəzi fermentlər bütün tip hüceyrələrdə tapılmışdır, çünki onlar bütün hüceyrələr üçün ümumi olan məhsulların (məsələn, zülalların, nuklein turşularının və fosfolipidlərin) sintezində iştirak edirlər və ya mənimsənilmiş qida maddələrindən enerjini toplayırlar (məsələn, hüceyrə tənəfüsü zamanı qlikoza və oksigenin suya və karbon iki oksidə çevrilməsi). Digər fermentlər yalnız müəyyən tip hüceyrələrdə mövcud olur, çünki onlar yalnız bü hüceyrə tipləri üçün məxsus olan kimyəvi reaksiyaları kataliz edirlər (məsələn, sinir hüceyrələrində olan fermentlər tirozini neyrotransmitter dopaminə çevirirlər). Hərçənd ki, bütün fermentlər hüceyrə daxilində yerləşirlər, amma bəziləri, məsələn qanda və həzm sistemində olduğu kimi hüceyrə xaricinə ifraz olunaraq orada fəaliyyət göstərirlər, bəziləri isə ümumiyyətlə orqanizmdən kənarda fəaliyyət göstərirlər (məsələn, zəhərli ilanlarda olan ilan zəhərindəki toksik fermentlər).

Bütün **katalizatorlarda** olduğu kimi (bax Fəsil 2), fermentlər reaksiyanın sürətini artırır, amma reaksiyaya girən məhsullar ilə reaksiyadan alınan məhsullar arasında sərbəst enejinin ΔG dəyişməsi ilə müəyyən olunan reaksiya dərəcəsinə təsir etmirlər və özləri də kataliz etdikləri reaksiya prosesində həmişə dəyişməz qalırlar. Fermentlər reaksiyanın sürətini **keçid vəziyyətinin** enerjisini aşağı salmaqla artırırlar, ona görə də buna nail olmaq üçün **fəallaşma enerjisi** tələb olunur (Şəkil 3-22). Sınaq şüşələrində, məsələn kömür və platin kimi katalizatorlar, reaksiya şəraitini asanlaşdırırlar, amma, adətən yalnız yüksək temperatur və ya təzyiq altında, yuxarı və ya aşağı pH şəraitində və ya üzvi həlledicilərdə. Amma, hüceyrə daxilində fermentlər sulu mühitdə və 37°C temperaturda, 1 atmosfer təzyiqində və fizioloji pH qiymətində, adətən pH 6.5-7.5 arasında, bəzi hallarda isə nisbətən aşağı olan pH qiyməti şəraitində çox səmərəli fəaliyyət göstərirlər. Qeyd etmək lazımdır ki, fermentlər, kataliz olunmayan reaksiyalarla və ya buna bənzər vəziyyətlə müqayisədə reaksiyanın sürətini 10^6-10^{12} dəfə artırmaqla həddən artıq böyük katalitik gücə malikdirlər.

Fermentin Fəal Mərkəzi Substrata Birləşərək Kataliz Prosesini Aparır

Frmentdə müəyyən amin turşuluarı fermentin spesifikliyinin və onun katalitik gücününün müəyyən edilməsi üçün çox vacibdir. Fermentin nativ konformasiyasında kritik əhəmiyyət kəsb edən amin turşuları (bu, adətən polipeptid zəncirin xətti ardıcıllığının müxtəlif hissələrindən bir yerə gəlir) bir-birinə çox yaxın yerləşir və zülalın səthində **fəal mərkəz** adlandırılan yarıq əmələ gətirirlər (Şəkil 3-23). Adətən fəal mərkəz tam zülalın kiçik bir həssəsini təşkil edir, zülalın bükülməsində iştirak edən qalan hissələr isə qarşılıqlı əlaqədə olaraq fəal mərkəzin tənzimlənməsini və başqa molekullarla qarşılıqlı təsirini nizamlayırlar.



ŞƏKİL 3-23 Tripsin fermentinin fəal mərkəzi. (a) Fermentin fəal mərkəzi (qırıq xətlərlə göstərilir) spesifik olaraq substrata birləşən substrat-birləşmə mərkəzindən (mavi) və katalizi aparan katalitik mərkəzdən (bənövşəyi) təşkil olunub. (b) Serin proteaza tripsinin bir hissəsini təmsil edən səth/lent hibrid təsviri. Katalitik mərkəzə malik olan fəal mərkəzin yarıqları (katalitik üçlüyün Ser-195, Asp-102 və His-57 yan zəncirləri şəkilə yapışmış kimi görünür) və substrat-birləşdirmə saytının yan-zəncir-spesifik substrat birləşmə cibi (mavi) adlanan hissəsi aydın görünür. [Verilənlər B. Sandler, M. Murakami, and J. Clardy, 1998, *J. Am. Chem. Soc.* **120**:595-596, PDB ID 1aq7.]

Fəal mərkəz, funksional cəhətdən iki əhəmiyyətli nahiyədən ibarətdir: ***substrat-birləşdirən mərkəz,*** bu mərkəz substratı və ya substratları tanıyıb onlara birləşir; və ***katalitik mərkəz***, substrat birləşdikdən sonra kimyəvi reaksiyanı həyata keçirir. Katalitik mərkəzdə olan katalitik qruplar amin turşularının yan zəncirləri və özül karbonil və amin qruplarıdır. Bəzi fermentlərdə katalitik və substrat-birləşdirən mərkəzlər çox yaxın olub hətta bir-birini örtür, bəzilərində isə bu iki rayon quruluş cəhətdən fərqlidirlər.

Substrat birləşdirən mərkəz fermentin spesifikliyini müəyyən edir, onun selektiv fəaliyyətini təmin edir. Fermentin substratının quruluşunda hətta bir və ya bir neçə atom dəyişilmə və ya onun geometriyasındakı nəzərə çarpmayan dəyişiklik (onun stereokimyası) başqa molekulun əmələ gəlməsinə səbəb olur, o artıq fermentin substartı olmur. Anticismlərin antigenlərə yuxarıda qeyd olunmuş spesifikliyində olduğu kimi, fermentin substrata spesifikliyi fermentin substrat birləşdirən mərkəzi ilə substrat arasında molekulyr komplementarlıq əsasında baş verir. Adətən, bir və ya çox az substrat birləşmə mərkəzinə tam uyğun gəlir.

"Substratın fermentlə birləşməsi açarın kilidə uyğun gəlməsi qaydası ilə baş verir" ideyası ilk dəfə olaraq 1894-cü ildə Emil Fişer tərəfindən irəli sürülmüşdür. Bu təklifin 1958-ci ildə Daniel Koşland tərəfindən verilmiş, ***induksiya olunan uuğunluq*** adlanan başqa bir variantı gstərdi ki, substrat birləşdirən mərkəz kilid kimi möhkəm deyil, əksinə dəyişkəndir və liqand birləşərkən optimal kataliz üçün formasının dəyişilməsi induksiya olunur. 1913-cü ildə **Leonor Mixailes və Maud Leonora Menten** ferment-substrat birləşməsi ideyasını təsdiq edən güclü dəlilləri ortaya qoydular. Onlar göstərdilər ki, substratın aşağı qatılığında, kimyəvi reaksiyanın gedişi substratın qatılığının artması ilə düz mütənasibdir, amma substratın qatılığı artdıqda və reaksiyanın gedişi **maksimal sürətə, V_{max}** platoya çatdıqda artıq reaksiya sürəti substratın qatılığından asılı olmayır, V_{max} qiyməti isə birbaşa reaksiya qatışığında iştirak edən fermentin miqdarı ilə düz mütənasib olur (Şəkil 3-24).

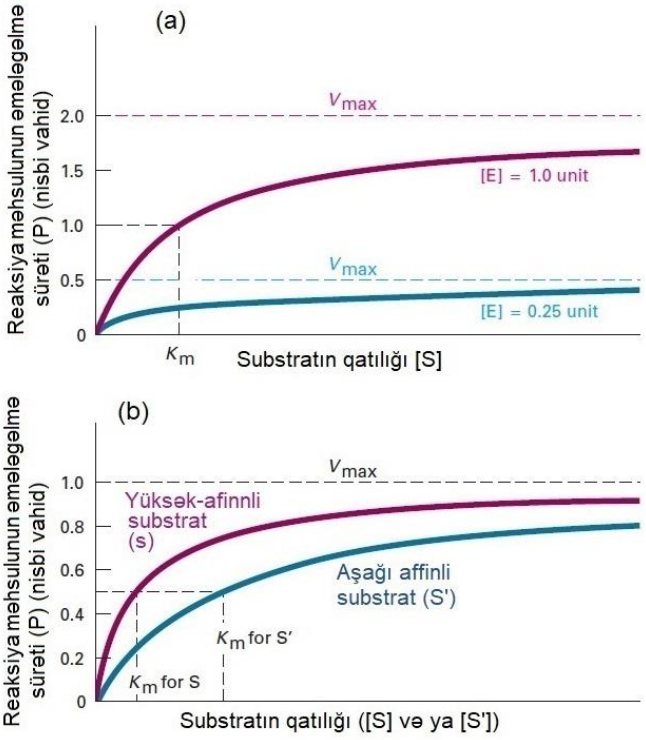
Mixailes və Menten belə nəticəyə gəldilər ki, bu xüsusiyyətlər substrat molekullarının (S) fermentdə (E) sabit və məhdud miqdarda olan saytlara birləşməsi nəticəsində baş verir və onlar bu nümunələrin birləmələrini ferment-substrat (ES) kompleksi adlandırdılar. Substratın yüksək qatılığında fermentdəki bütün birləşmə mərkəzləri substratla birləşmış olurlar və buna substratla *doymuşdur* deyirlər, yəni əlavə birləşmə mərkəzləri yoxdur və reaksiya maksimal sürətə çatmışdır. Mixailes və Menten belə hesab etdilər ki, ES kompleksi birləməmiş ferment və substratla tarazlıqdadır və substratın reaksiya məsuluna (P) çevrildiyi geriyə dönməyən prosesdə aralıq mərhələdə yerləşir (Şəkil 3-25):

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$$

və xüsusi bir substrat qatılığında [S] reaksiya məhsulunun əmələ gəlməsinin V_0 sürəti, hazırki dövürdə ***Mixaelis-Menten bərabərliyi*** adlanan tənliklə verilir:

$$V_0 = \mathrm{V_{max}} \frac{[S]}{[S]+\mathrm{K_m}} \qquad (3\text{-}1)$$

burada Mixayles konstant K_m, fermentin substrata qarşı affinliyinin (uyğunluğunun) ölçüsüdür, bu maksimal reaksiya sürətinin yarısında substratın qatılılğıdır (başqa sözlə, Şəkil 3-24-də 1/2 V_{max}). K_m təbiətinə görə müəyyən dərəcədə dissosasiya konstantı K_d ilə oxşardır amma, tam eyni deyildir (bax Fəsil 2). K_m qiyməti nə qədər kiçik olarsa, ferment substratın durulaşdırılmış məhluldan reaksiya məhsulunu daha effektiv (sürətlə) əmələ gətirir, və reaksiyanın yarım-maksimal sürətinə tez çatması üçün daha aşağı substrat qatılığı lazım olur. K_d qiyməti nə qədər kiçik olarsa 50 faiz liqand zülal (ferment-zülal) birləşməsi üçün daha aşağı liqand qatılığı lazımdır. Hüceyrələrdə müxtəlif kiçik molekulların qatılığı, bunlara təsir edən müxtəlif fermentlərin K_m qiymətində olduğu kimi geniş şəkildə dəyişilir. Yaxşı bir qayda odur ki, substratın hüceyrədaxili qatılığı, onun birləşdiyi fermentin K_m qiymətinə bərəbər olur və ya çox az miqdarda ondan böyük olur.



ŞƏKİL 3-24 Fermentlə kataliz olunan reaksiyalar üçün K_m və V_{max}. K_m və V_{max} ilkin reaksiya sürətinin substratın qatılığından asılılığının analizlərindən təyin edilmişdir. Fərz olunan kinetik əyrinin forması fermentlə kataliz olunan, bir substartın (S) reaksiya məhsuluna (P) çevrildiyi sadə fermentativ reaksiya üçün xarakterikdir. İlkin reaksiya sürəti ferment substarata əlavə olunduqdan dərhal sonra, onun qatılığı nəzərə çarpacaq dərəcədə dəyişməmiş halda ölçülmüşdür. (a) Substrat [S] qatılığının funksiyası kimi fermentin [E] iki müxtəlif qatılığında ilkin reaksiya sürətinin əyriləri. Reaksiya maksimumunun yarısına çatan [S] Mixayles konstantı K_m-dir, yəni S-in P-ə çevrilməsi üçün E-in affinlik ölçüsüdür. Fermentin qatılığının dörd dəfə artırılması reaksiyanın sürətini də mütənasib artırır, belə ki, V_{max} dörd dəfə artmış olur, amma K_m dəyişilməz qalır. (b) Fermentin substrata yüksək affinliyi olan S və fermentin substrata aşağı ayfinliyi olan S' hallarında substratın qatılığına qarşı ilkin reaksiya sürətinin əyrisi. Qeyd etmək lazımdır ki, V_{max} hər iki substrat üçün eynidir, çünki [E] eynidir, amma, K_m aşağı-affinli substrat S' üçün yuxarıdır.

Substrat qatılığının doymuş halında reaksiyanın gedişi fermentlər arasında çox dəyişilir. Frmentin vahid fəal

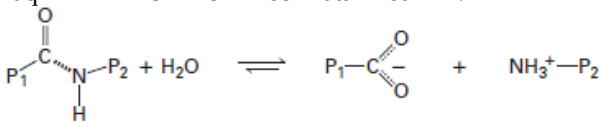
mərkəzində saniyə ərzində maksimum sayda substrat molekulları reaksiya məhsuluna çevrilir ki, bu da ***çevrilmə sayı*** adlanır, bu çox zəif ferment üçün 1-dən az ola bilər. Bu, çevrilmə sayı çox sürətli fermentlərdən olan karbon anhidraza üçün 6×10^5 molekul/saniyədir. Çox fermentlər substratın reaksiya məhsuluna çevrilməsi prosesini, son məhsul əmələ gəlməmişdən öncə müxtəluf ferment-substrat kompleksinin daxil olduğu (ES, ES' ES" və sair) çoxsaylı diskret kimyəvi raeksiyalara bölməklə kataliz edirlər:

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons ES' \rightleftharpoons ES'' \rightleftharpoons \cdots E + P$$

Bu cürə çoxmərhələli reaksiya üçün enerji profili çoxsaylı enişlərə və yoxuşlara malik olur (Şəkil 3-26) və belə reaksiyalarda fermentin reaksiyanı necə kataliz etməsini öyrənmək üçün aralıq məhsulların izlənməsi metodları da işlənib inkişaf etdirilmişdir.

Serin Proteazalar Fermentin Fəal Mərkəzlərinin Necə İşlədiyini Nümayiş Etdirirlər

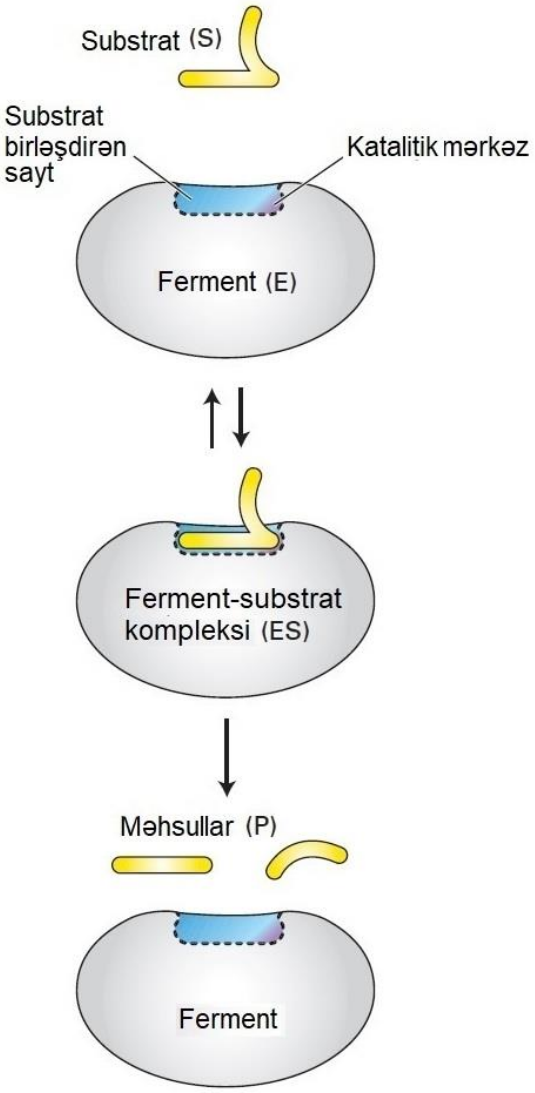
Serin proteazalar zülal-kəsən və ya proteolitik fermentlər ailəsi olub bütün bioloji aləmdə, qidanın həzmində (mədəaltı vəzin ferment tripsin, kemotripsin və elastaza), qan laxtalanmasının tənzimlənməsində (trombin fermenti) istifadə olunur, hətta ipəkqurdunun kəpənəyi puplardan çıxarkən onlardan (kokunaza fermenti) istifadə edirlər. Bu sinifə aid olan fermentlər, çoxmərhələli reaksiyalarda fermentlərin substrat-birləşdirən mərkəzinin və katalitik mərkəzinin birlikdə necə fəaliyyət göstərərək substratı məhsula çevirdiyini çox gəzəl təsvir edirlər. Biz burada göstərəcəyik ki, tripsin və təkamülcə ona çox yaxın olan iki mədəaltı vəz proteazaları, kemotripsin və elastaza peptid əlaqələrinin kəsilməsini necə kataliz edirlər:



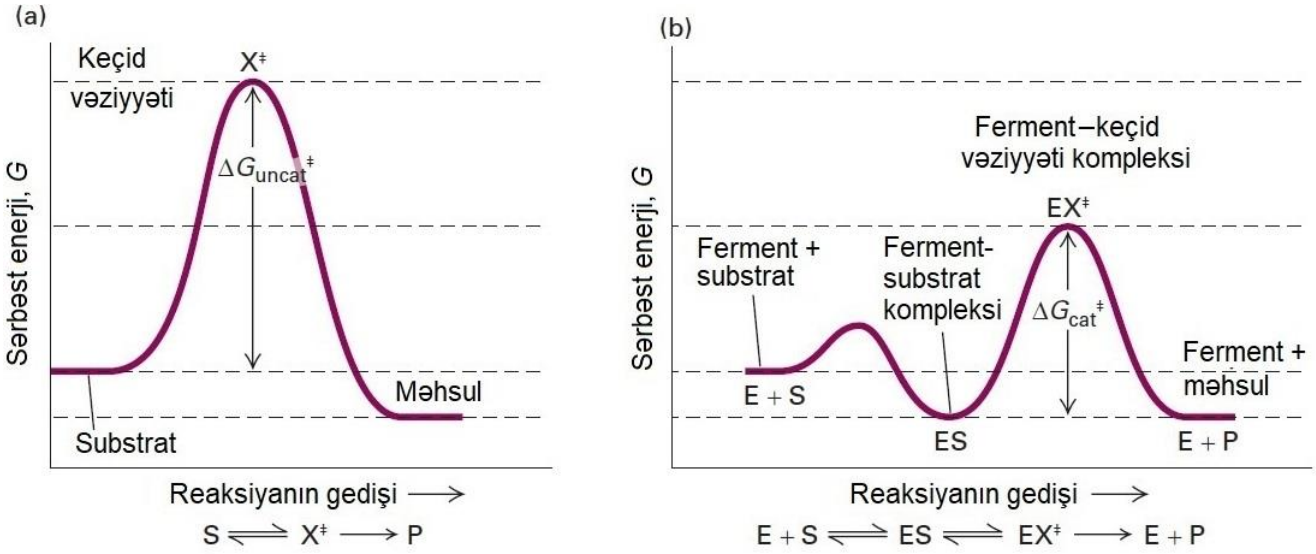
burada P_1 kəsilməli olan substrat polipeptiddə peptid əlaqələrinin N-sonluğunda zülalın bir hissəsidir, P_2 isə zülalın C-sonluğunda olan hissəsidir. Biz əvvəlcə, serin proteazanın spesifik olaraq öz substratlarına necə birləşdiyini, sonra isə katalizin necə baş verdiyi detalları ilə göstərilir.

Şəkil 3-27a, substrat polipeptidin tripsinin fəal mərkəzində substrat-birləşdirən sayta necə birləşdiyini göstərir. Birləşmə üçün iki əsas qarşılıqlı əlaqə var. Birincisi, substrat (qara polipeptid özül) və ferment (mavi polipeptid özül) β vərəqlərdəkinə bənzəyən hidrogen əlaqələrini əmələ gətirirlər. İkincisi, substratda hansı peptid əlaqəsinin kəsiləcəyini təyin edən substratın əsas yan zənciri fermentin ***yan-zəncirə-spesifik birləşdirmə cibi*** daxilinə tərəf, aşağıda Asp-189-un mənfi yan zənciri yerləşən hissəyə doğru uzanır. Tripsin substratı, uzun müsbət yan zəncirə malik olan amin turşusunun (argininin və ya lizinin) karboksil (C=O) hissəsindən hidroliz etməyə daha çox meyillidir, çünki yan zəncir fermentin yan-zəncirə-spesifik birləşdirmə cibinin mənfi yüklənmiş Asp-189 qalığı ilə stabilləşir.

Ümumiyyətlə, oxşar spesifiklik ciblərinbdə olan yüngül quruluş fərqləri iki oxşar (qohum) serin proteazaların substrat spesifikliyindəki fərqləri izah etməyə kömək edir: kemotripsin daha çox aromatik qrupların olduğu (Phe, Tyr, Trp olduğu kimi) qalıqlara meyillidir, elastaza isə Gly və Ala-da olan kiçik yan zəncirlərə çox üstünlük verir (Şəkil 3-27b). Kemotripsindəki yüksüz Ser-189 imkan verir ki, yüklənməmiş, böyük hidrofob yan zəncirlər cibə stabil birləşsinlər. Elastazanın spesifikliyinə, onun birləşmə cibinin yan tərəfində ola qlisinlərin tripsindəki şaxələnmiş alfatik yan zəncirə malik olan və cibə mane olan valinlərlə (Val-216 və Val-190) əvəz olunması təsir etmişdir (Şəkil 3-27b). Nəticədə, substratdakı böyük yan zəncirlərin elastazadakı cibə yerləşməsinə mane olunmuşdur, amma bu mövqedə alaninin qısa yan zənciri olduğu halda substrat asanlıqla birləşir və uyğun olaraq kəsilməyə məruz qalır.



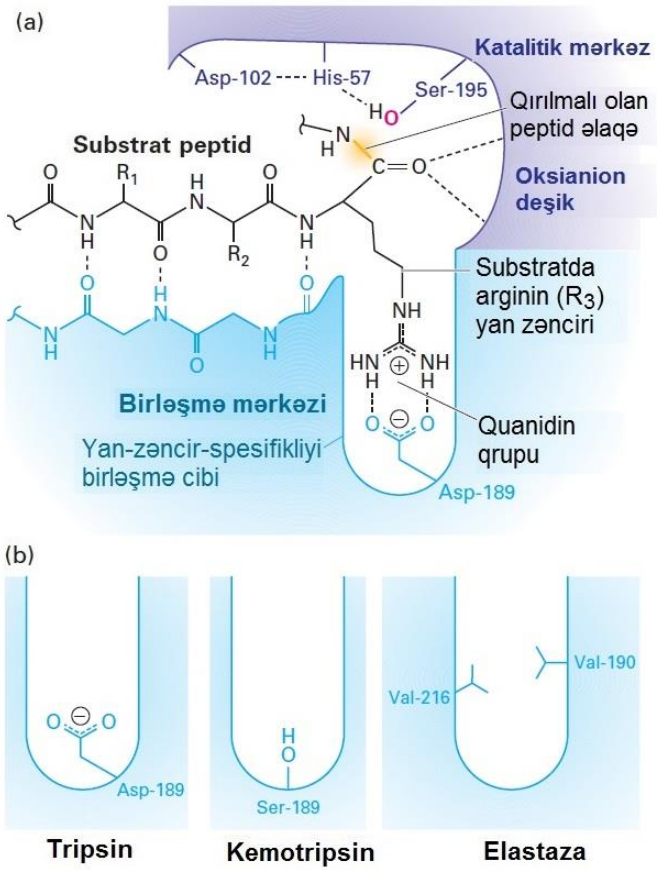
Şəkil 3-25 Fermentativ reaksiyanın sxematik modeli. Fermentativ kinetika göstərir ki, fermentlər (E) substrat molekullarına (S) müəyyən olnmuş məhdud sayda fəal mərkəzlərlə birləşirlər. Birləşdikdən sonra onlar ferment-substrat kompleksi (ES) adlanırlar. ES komplekslər birləşməmiş substrat və ferment molekullari ilə tarazlıqda olurlar, və substratın reaksiya məhsuluna (P) çevrilməsi zamanı aralıq mərhələdə dururlar.



ŞƏKİL 3-26 Reaksiyanın kataliz olunmayan və fermentlə çoxmərhələli kataliz olunan reaksiyalarda sərbəst-enerji profili. (a) Vahid yüksək-enerjili yerdəyişmə vəziyyəti ilə substratı (S) məhsula (P) çevirən, ehtimal olunan kataliz olunmayan sadə reaksiyanın sərbəst-enerjili reaksiya profili. (b) Çoxsaylı fermentlər belə reaksiyanı, reaksiya prosesini çoxsaylı diskret mərhələlərə bölməklə kataliz edirlər, indiki halda ES kompleksin ilkin formalaşması vahid yerdəyişmə vəziyyətində (EX) sərbəst fermentə və P-ə çevrilməklə davam etmişdir. Bu mərhələlərin hər biri üçün fəallaşma enerjisi kataliz olunmayan reaksiyanın fəallaşma enerjisindən əhəmiyyətli dərəcədə azdır: beləliklə ferment reaksiyanın gedişini gözlənilmədən gücləndirir.

Zülal substratlarında peptid əlaqələrini hidroliz etmək üçün, hər üç ferment katalitik saytda 195-ci vəziyyətdə serinin yan zəncirindəki hidroksil qrupunu istifadə edir. Ser-195, His-57 və Asp-12-nin yan zəncirləri ilə əmələ gələn katalitik üçlük əsasən iki-mərhələli hidroliz reaksiyasında iştirak edir. Şəkil 3-28, peptid əlaqələrinin qırılmasında katalitik üçlüyün, Ser-195-in hidroksil oksigeninin substratdakı karbonil karbonuna hücumunu təmin edən Asp-102 və His-57 ilə necə kooperativ fəaliyyətdə olduğunu göstərir. Bu hücum əvvəlcə karbona birləşmiş dörd qrupla (tetrahedral aralıq vasitəçi) qeyri stabil keçid vəziyyəti yaradır. Sonra C-N peptid əlaqələrini qıraraq substrat zülalın bir hissəsini (NH_3–P_2) buraxır, amma zülalın başqa bir hissəsi efir əlaqələri ilə serinin oksigeninə birləşərək fermentə kovalent birləşmiş vəziyyətdə qalır, kifayət qədər stabil asil-ferment aralıq məsulunu əmələ gətirir. Sonra bu oksigenin digər, qeyri-stabil tetrahedral aralıq vasitəçinin daxil olduğu, başqa reaksiyada sudan alınmış oksigenlə əvəz olunması, son məhsulun (P_1-COOH) ayrılmasına səbəb olur. Tetrahedral aralıq keçid vəziyyətləri, fermentin ***oksianion deşik*** adlandırılan özül amin qruplarının əmələ gətirdiyi hidrogen əlaqələri ilə qismən stabilləşir. Böyük serin proteazalar ailəsi və fəal mərkzlərində serin olan bunlara oxar başqa fermentlər göstərir ki, oxşar reaksiyaları kataliz etmək üçün effektiv reaksiya mexanizmi fərqli fermentlər tərəfindən təkrar-təkrar necə istifadə olunur.

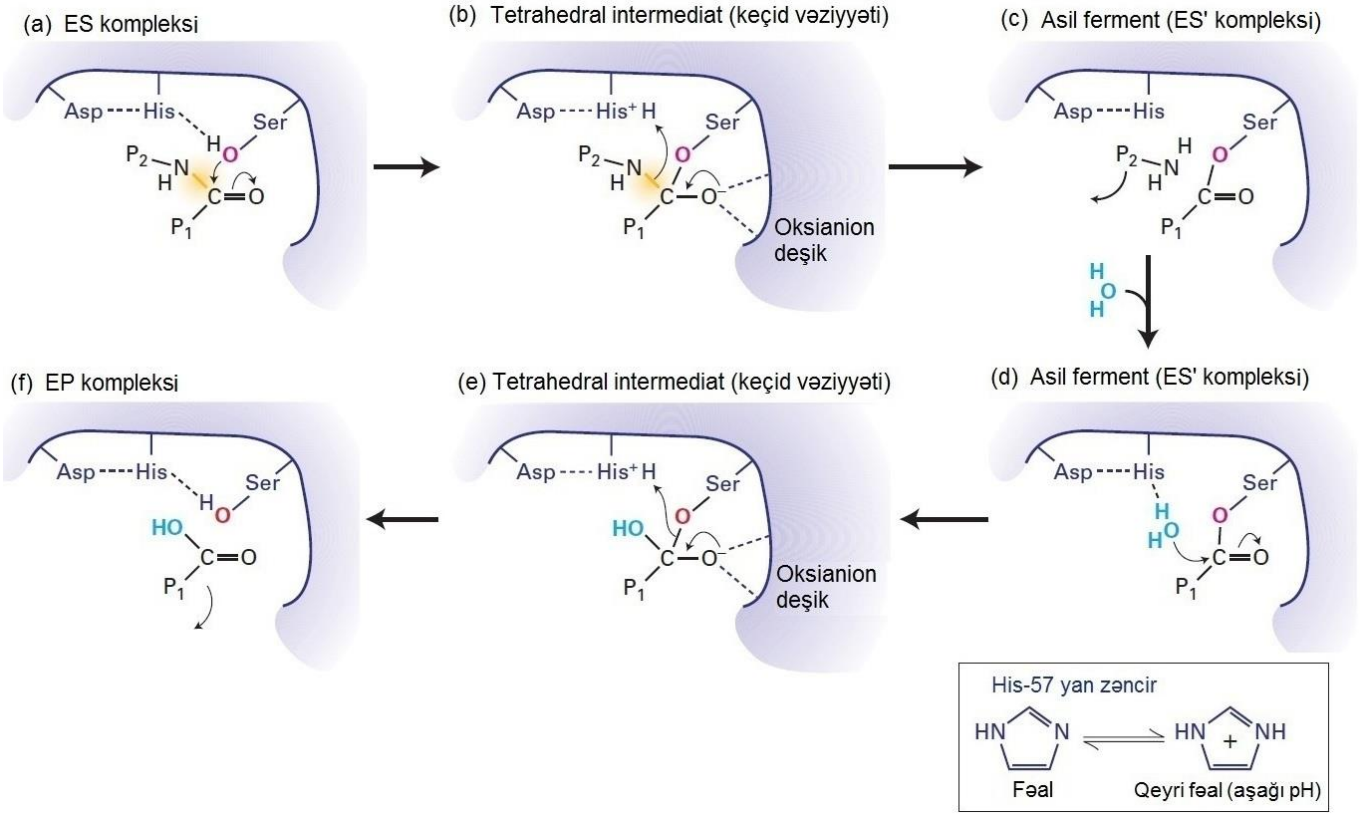
Serin proteaza mexanizmi fermentativ katalizin bir neçə əsas xüsusiyyətlərini əhatə edir. Birincisi, fermentlərin katalitik mərkəzi, keçid vəziyyətini stabilləşdirməyi, beləliklə fəallaşma enerjisini aşağı salmağı və ümumi reaksiyanı sürətləndirməyi yaradıb inkişaf etdirmişlər. İkincisi, çoxsaylı yan zəncirlər, polipeptid özüllə birlikdə diqqətlə üç-ölçülü quruluşda təşkil olunmuşlar, substratı kimyəvi cəhətdən reaksiya məhsuluna çevirmək üçün, əksər hallarda çoxmərhələli reaksiyalarla birlikdə fəaliyyət göstərirlər.



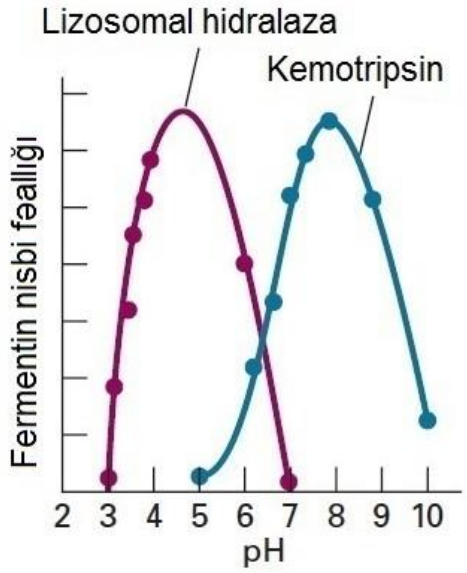
ŞƏKIL 3-27 Tripsinə-bənzər serin proteazalarda substratın fəal mərkəzə birləşməsi. (a) Tripsinin fəal mərkəzi (çəhrayı və mavi molekullar) substratla (qara molekul) birləşmiş halda. Substrat,

birləşmə mərkəzi ilə iki zəncirli β vərəq əmələ gətirir, və substratda argininin (R_3) yan zənciri fermentdəki yan-zəncir-spesifik birləşmə cibinə birləşir. Onun müsbət yüklənmiş quanidin qrupu fermentin Asp-189 qalığının mənfi yüklənmiş yan zənciri ilə stabilləşir. Bu cürə birləşmə argininin peptid əlaqələrini, uyğun olaraq fermentin fəal saytındakı katalitik üçlüklə (triadada) (Ser-195, His-57 və Asp-102 yan zəncirləri) kataliz olunan hidroliz üçün düzləndirir. (b) Yan-zəncirə-spesifik birləşdirmə cibini örtən amin turşuları onun formasını və yükünü təyin edir və beləliklə, onun birləşdirmə xassəsini müəyyən edir. Tripsin arginin və lizinin müsbət yüklənmiş yan zəncirlərini, kemotripsin fenilalanin kimi qalığın böyük, hidrofob yan zəncirlərini, elastaza isə qlisin və alanindəki kimi kiçik yan zəncirləri yerləşdirir. Bax J.J.Perona and C.S.Craik, 1997, *J.Biol.Chem.*272(48)29987-29990.

Üçüncüsü, serin proteazalardakı Ser-195-in hidroksil qrupundan hidrogeni uzaqlaşdırmaq üçün His-57-nin imidazol qrupu əsas (qələvi) kimi fəaliyyət göstərdiyi halda olduğu kimi, bir və ya daha çox amin turşusunun yan zəncirləri vasitəsi ilə həyata keçirilən turşu-əsas tipli katalizlər fermentlər tərəfindən tez-tez istifadə olunur. Nəticədə, çox hallarda, katalitik mərkəzdə yalnız bir və ya daha artıq amin turşusunun yan zəncirləri xüsusi ionlaşmış vəziyyətdə (protonlaşmış və ya qeyri protonlaşmış) katalizə uyğun gəlir və beləliklə fermentin fəallığı pH-dan asılı ola bilir. Məsələn, pKa ~6.8 olan serin proteazlarda His-57-in imidazolu yalnız substrat protonlaşmayan halda Ser-195 hidroksil hücumuna kömək edə bilər. Beləliklə, pH<6.8 olduqda, imidazol protonlaşmış olduğundan proteazaların fəallığı aşağı olur, və pH 4-8 diapozonunda pH fəallığı profilinin forması His-57 yan zəncirinin titirləşməsinə uyğun gəlir ki, bu da kiçik kənarlanma ilə 6.8-dən yaxın pH-da Enderson-Hasselbalç bərabərliyi ilə uzlaşır (Şəkil 3-29-də kemotripsinə bax, həmçinin Fəsil 2-ə bax). Yüksək pH qiymətində fəallıq düşür və kilsə zəngi formalı əyri alınır, çünki zülalın amin sonluğunda amin qrupu (pK_a~9) protonsuzlaşdığından (deprotonlaşdığından) zülalın düzgün bükülməsi pozulur, nəticədə fəal mərkəz yaxınlığında zülalın konformasiyası pozulur.



ŞƏKİL 3-28 Serin-proteaza-vasitəsi ilə peptid əlaqələrinin hidrolizi mexanizmi. Serin proteazaların fəal mərkəzində Ser-195, His-57 və Asp-102 qalıqlarının yaratdığı katalitik üçlük (triad) hədəf zülalda peptid əlaqələrin hidrolizini çox-mərhələli mexanizmlə həyata keçirirlər. (a) Polipeptid substrat fəal mərkəzə birləşdikdən sonra (bax Şəkil 3-27) ES kompleksini əmələ gətirir, Ser-195-in hidroksil qrupunun oksigeni substratın hədəf peptid əlaqəsindəki (sarı) karbonil karbonuna hücum (attack) edir. Elektronların hərəkəti oxlarla göstərilmişdir. (b) Bu hücum nəticəsində ***tetrahedral aralıq vasitəçi*** adlanan keçid vəziyyəti formalaşır və burada substrat oksigeninin mənfi yükü fermentin ***oksianion deşiyi*** ilə əmələ gələn hidrogen əlaqələri vasitəsi ilə stabilləşir. (c) Əlavə elektron yerdəyişməsi peptid əlaqələrinin qırılmasına, reaksiya məhsullarından birinin (NH_2-P_2) buraxılmasına və asil fermentin (ES' kompleksin) əmələ gəlməsinə səbəb ollur. (d) Reaksiya mühitindəki su molekulunun oksigeni sonra asil fermentindəki karbonil karbonuna hücum edir. (e) Bu hücum nəticəsində ikinci tetrahedral aralıq vasitə yaranır. (f) Əlavə elektron yerdəyişməsi Ser-195-substrat əlaqəsinin qırılmasına (EP kompleksin əmələ gəlməsinə), sonuncu isə reaksiya məhsulunun (P_1-COOH) buraxılmasına səbəb olur. Hidrogen əlaqəsi ilə Asp-102-nin yan zəncirinə birləşərək düzgün orientasiyada olan His-57-in yan zənciri, reaksiya boyu protonları geri almaqla və ya verməklə katalizə şərait yaradır (*əlavə*). Əgər pH çox aşağı olarsa və His-57-nin yan zənciri protonlaşırsa, o katalizdə iştirak edə bilmir və ferment qeyri fəal olur.



ŞƏKİL 3-29 Fermentin fəallğının pH-dan asılılığı. Bəzi hallarda, düzgün substratın birləşməsi və ya katalizinə imkan yaratmaq üçün və ya fermentin düzgün konformasiyanı almasına imkan vermək üçün fermentin fəal mərkəzində və ya hər-hansı başqa bir yerində ionlaşa bilən (pH-titirləşdirilə bilən) qruplar çox hallarda ya protonlaşmalı, ya da deprotonlaşmalıdır (protonsuzlaşmalıdır). pH funksiyası kimi fermentin fəallığının ölçülməsi bu qrupların pK_a-larının identifikasiyasında istifadə oluna bilər. Kemotripsin kimi mədəaltı vəzin serin proteazaları (*sağdakı əyri*), fəal mərkəzdə His-57-nin (pK_a~6.8 kataliz üçün tələb olunur) və zülalın amin sonluğunun (pK_a~9 zülalın konformasiyası üçün tələb olunur) titirlənməsinə əsasən pH 8 ətrafında maksimum fəallıq göstərirlər. Lizosomlar daxilində onların fəaliyyət göstərdiyi daxili aşağı pH-a nail olmaq üşün, çox lizosomal hidrolazalar aşağşı pH optimumu göstərmək üçün (~4.5) yaranıb inkişaf etmişlər. [Verilənlər P.Lozano, T.De-Diego, and J.L.Iborra, 1997, Eur.J.Biochem. 248(1):80-85 and W.A.Judice et al., 2004, Eur.J.Biochem.271(5):1046-1053 götürülmüşdür.]

Fermentin fəallığının pH-a qarşı həssaslığı, substrata birləşməkdə birbaşa iştirak edirlər və ya zülalın konformasiyasına təsir edən qruplar kimi katalitik qrupların ionlaşmasında olan dəyişmələr hesabına ola bilər. Mədəaltı vəzin proteazaları bağırsaqlarda neytral və ya zəif əsas mühitində fəaliyyət göstərmək üçün yaranmışlar; buna görə də onların pH optimumu təxminən ~8 bərabərdir. Turş mühitdə fəaliyyət göstərən proteazalar və digər hidrolitik fermentlər fərqli katalitik mexanizmə malik olmalıdırlar. Buna misal, mədədə (pH~1) iştirak edən pepsin proteazası kimi fermentlər, və ya hüceyrə daxilində makromolekulların parçalanmasında əsas rol oynayan lizosomlarda (pH~4.5) (Şəkil 3-29-də lizosomal fermentlərə aid olanlara bax,) olan fermentlər aiddirlər. Həqiqətən də, lizosomlarda geniş çeşiddə müxtəlif biomolekulları (zülalları, lipidləri və sair) parçalayan hidrolazalar sitozolda (pH~7.0) müqayisəli dərəcədə qeyri fəal olurlar, bu da fermentin membrana-birləşmiş lizosomlardan çıxa biləcəyi halda hüceyrəni özü-özünü parçalamasından müdafiə edir.

Fermentativ katalizin əsas xüsusiyyətlərindən biri, serin proteazalarda görünməyən, amma çox sayda başqa fermentlərdə tapılan ***kofaktor*** və ***prostetik qurupların*** olmasıdır. Bu "köməkedici" quruplar qeyri-polipeptid kiçik molekullar və ya ionlar (məsələn, dəmir, mis, sink maqnezium və sair) olub fermentin fəal mərkəzinə birləşmiş olurlar və reaksiyanın mexanizmində əhəmiyyətli rol oynayırlar. Fermentlərdə kiçik üzvi prostatik quruplar da həmçinin ***koenzimlər (kofermentlər***) adlanır. Bunlardan bəziləri reaksiya gedişində kimyəvi modifikasiyalara məruz qalırlar, ona görə də, hər bir reaksiyadan sonra onların ya regenerasiyası ya da əvəz olunması lazım gəlir; bəziləri isə modifikasiya olunmur. Buna misal kimi NAD^+ (nikotinamid adenin dinukleotid), FAD (flavin adenin dinukleotid) (bax Şəkil 2-33), və hemoqlobində oksigeni birləşdirən və ya bəzi sitoxromlarda elektronu daşıyan hem quruplarını (bax Şəkil 12-20) göstərmək olar. Beləliklə fermentlərlə kataliz olunan kimyəvi reaksiyalar polipeptid zəncirində məhdud saydə amin turşusu tiplərinin olması ilə məhdudlaşmır. Müxtəlif vitaminlər - məsələn, B vitaminləri tiamin (B_1), riboflavin (B_2), niasin (B_3), piridoksin (B_6) və məməlilərin hüceyrələri tərəfindən sintez oluna bilməyən C-vitamini ya koferment (koenzim) kimi fəaliyyət göstərirlər ya da kofermentlərin yaradılmasında istifadə olunurlar. Ona görə də, laboratoriya şəraitində saxlanılıb artırılan heyvan hüceyrələrinin lipidli böyümə mühitinə vitaminlər əlavə olunmalıdır (bax Fəsil 4).

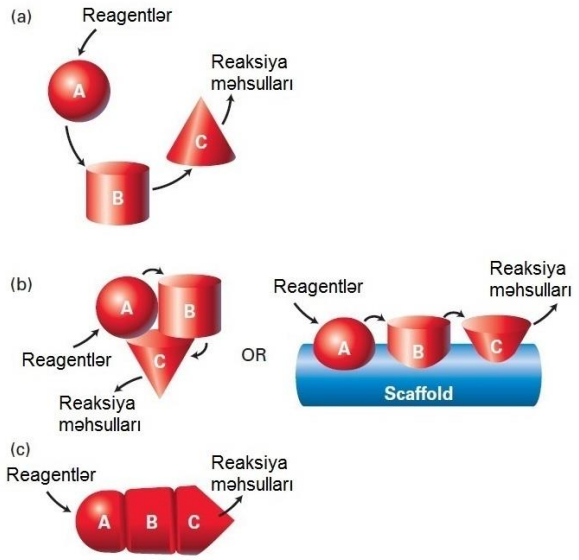
Fermentin fəal mərkəzinə birləşib katalitik reaksiyanı qıran kiçik molekullar ***fermentin ingibitiorları*** adlanır. Belə ingibitorlar hüceyrədə və bütöv orqanizmdə fermentlərin rolunu tədqiq etmək üçün istifadə olunan səmərəli alətlərdir. Birbaşa fermentin birləşdirmə mərkəzinə birləşən və birləşmək üçün birbaşa normal substratla yarışan (rəqabətə girən) ngibitorlar *rəqabətli ingibitorlar* adlanır. Qeyri rəqabətli ingibitorlar fermentlərin fəal mərkəzlərinə başqa yolla təsir edən, məsələn fermentin başqa mərkəzlərinə (saytlarına) birləşərək onun konformasiyasını dəyişməklə təsir edən ingibitorlardır. Fermentin ingibitorları genlərdə mutasiyaların istifadəsini tamamlayır və RNT müdaxiləsi (RNA interference RNTi) adlanan bu metod hüceyrədə fermentin funksiyasını tədqiq etmık üçün (bax Fəsil 6) istifadə olunur. Hər üç yanaşmada, fermentin fəallığının qırılmasının hüceyrədə yaratdığı nəticələr fermentin normal funksiyasını öyrənmək üçün istifadə edilə bilər. Eyni yanaşmalar qeyri-fermentativ makromolekulların funksiyalarının öyrənilməsində də tətbiq edilə bilər. İgibitorların öyrənilməsindən alınan nəticələrin şərh edilməsi çətinləşə bilər, amma, bir çox hallarda baş verdiyi kimi, ingibitor birdən daha artıq zülalların fəallığına mane olan halda.

Zülalların fəallığının kiçik-molekullarla ingibirləşməsi dərman preparatlarının, həmçinin kimyəvi silah agentlərinin çoxunun əsasında durur. Aspirin, tsiklooksigenaza adlandırılan fermentləri ingibirləşdirir, bu fermentin məhsulları ağrıların baş veriməsinə səbəb olur. Zarin və əsəb sisteminə təsir edən başqa qazlar həm serin proteazalar və buna oxşar fermentlərdə, həm də sinir keçereceleyində iştirak edən asetilxolin esterazalarda (bax Fəsil 22) serinin fəal hidroksil qrupları ilə reaksiya girir.

Ümumi Yolun Fermentləri Çox Vaxt Biri-biri ilə Fiziki Bağlı Olurlar

Ümumi metabolik proseslərdə iştirak edən fermentlər (məsələn, qlikoliz zamanı qlükozanın piruvata parçalanması; bax Fəsil 12) adətən hüceyrənin eyni hissəsində, sitozolda, ya membranda və ya hər hamsı orqanoid daxilində bir bölmədə yerləşirlər. Bu bölmə daxilində, bir reaksiyanın məhsulu diffuziya edərək

metabolik yolda olan növbəti fermentə keçə bilir. Amma, təsadüfi yerdəyişmələrə səbəb olan diffuziya zəif getdiyindən molekulların fermentlər arasında yerdəyişməsi üçün kifayət qədər səmərəsiz prosesdir (Şəkil 3-30a). Bu maneəyə üstün gəlmək üçün hüceyrə eyni metabolik yolda olan fermentləri bir-birinə yaxın gətirən mexanizmi yaratdı və bu proses **metabolik cütləşmə və ya birləşmə (metabolic coupling)** adlanır.



ŞƏKİL 3-30 Fermentlərin səmərəli multiferment kompleksdə toplanması. Burada təsvir olunmuş ehtimal olunan reaksiya yolunda, ilkin reaksiyaya girən (reaktant) son reaksiya məhsuluna ardıcıl üç fermentin: A, B və C fermentlərin təsiri ilə çevrilir. (a) Ferment məhlulda sərbəst olanda və ya hətta eyni hüceyrə bölməsində (compartment) yerləşəndə reaksiya ardıcıllığında aralıq məhsullar bir fermentdən başqasına, çox zəif proses olan diffuziya ilə keçməlidirlər. (b) Fərdi (individual) fermentlər ya özləri yada skafold yolu ilə çoxsubvahidli kompleksdə birləşdikdə diffuziya güclü surətdə azalır və ya tamam yox olur. (c) Fermentlər genetik səviyyədə qovuşan və vahid polipeptid zəncirin domenlərinə çevrilən zaman müxtəlif katalitik fəallıqların yaxın inteqrasiyası baş verir.

Belə sadə mexanizmdə müxtəlif katalitik fəallığa malik olan polipeptidlər multimer fermentlərin subvahidləri kimi və ya onları bir yerdə saxlayan ümumi "skafold" kimi (Şəkil 3-28a) bir yerə yığılaraq klaster əmələ gətirirlər (bax Şəkil 3-30b). Bu cürə düzülüş bir reaksiyanın məhsuluna imkan verrir ki, birbaşa metabolik yolda olan növbəti fermentə yönəlsin. Bəzi hallarda, bir-birindən asılı olmayan zülallar genetik səviyyədə bir yerə qovuşaraq vahid çoxdomenli, çoxfunksiyalı fermenti yaradırlar (Şəkil 3-30c). Adətən metabolik cütləşməyə, bu fəsilin əvvəlində müzakirə olunduğu kimi, böyük çoxzülallı komplekslər daxil olur.

3.2 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSIYALARI

Zülalların Birləşməsi və Fermentativ Kataliz

- Zülalın funksiyası onun liqandlar adlanan başqa molekullara birləşmək qabliyyətindən asılıdır. Məsələn, anticismlər antigenlər kimi məlum olan liqandlar qrupuna birlişirlir, fermentlər substratlar adlanan reaksiyaya girən və kimyəvi reaksiyalarla reaksiya məhsullarına çevrilən maddələrə birləşirlər.
- Zülalın xüsusi liqanda spesifikliyi onun bir və ya bir-birinə oxşar bir neçə liqanda üstünlüklə birləşmək qabliyyətidir. Zülalın xüsusi liqanda affinliyi onun liqanda birləşməsinin möhkəmliyidir, adətən bu dissosasiya konstantı K_d ilə ifadə olunur.
- Zülalların liqandlara birləşməsi zülallardakı liqand birləşdirən mərkəzlə müvafiq liqand arasındakı molekulyar komplementarlıq əsasında baş verir.
- Fermentlər katalitik zülallar olub hüceyrədə baş verən reaksiyaların gedişini, fəallaşma enerjisini aşağı salmaqla və keçid-vəziyyətindəki aralıq vasitəçiləri stabilləşdirməklə sürətləndirirlər (bax Şəkil 3-22).
- Fermentin adətən zülalın kiçik bir hissəsini təşkil edən fəal mərkəzi iki funksional hissədən təşkil olunub: substrat birləşdirən mərkəz və katalitik mərkəz. Substrat birləşdirən mərkəz fermentin substratla molekulyar komplementarlığına və keçici vəziyyətinə əsaslanaraq onların incə spesifikliyini həyata keçirir.
- Substratın (S) fermentə (E) ilkin birləşməsi ferment-substrat (ES) kompleksinin əmələ gəlməsi ilə nəticələnir, və son reaksiya məhsulu (P) əmələ gələnə qədər fermentin fəal mərkəzində katalitik qrupla kataliz olunan bir və ya daha artıq reaksiyalara məruz qalır.
- Substrat qatılğına qarşı reaksiya sürətinin qrafikindən fermentin iki xarakterik parametri təyin oluna bilər: substratı məhsula çevirmək üçün fermentin affinlik ölçü vahidi olan Mixailes konstantı $\boldsymbol{K_m}$, və fermentin katalitik gücünün ölçüsü maksimal reaksiya sürəti $\boldsymbol{V_{max}}$ (bax Şəkil 3-24).
- Fermentlə-kataliz olunan reaksiyanınn sürəti çevrilmə sayı (substratın qatılığı şəraitində vahid fəal mərkəzdə məhsula çevrilmiş substrat molekullarının sayı), 1-dən 6×10^5 molekul/saniyə arasında dəyişməklə güclü surətdə fərqlənir.
- Çox fermentlər substratın reaksiya məhsuluna çevrilməsini, fermentativ prosesi çoxsaylı ayrı-ayrı (diskret) kimyəvi reaksiyalara bölməklə kataliz edirlər, bu reaksiyalar zamanı müxtəlif ferment-substrat kompleksləri əmələ gəlir (ES', ES" və sair).
- Serin proteazalar, Ser-195, His-57, və Asp-102-nin yan zəncirlərinin katalitik qruplarından istifadə edərək zülal substratlarında peptid əlaqələrini hidroliz edirlər. Serin proteazaların birləşmə mərkəzindəki xüsusi birləşmə cibini əmələ gətirən amin turşuları zülal substratda hidroliz olunacaq peptid əlaqəsinin amintuşu qalığını təyin edir və proteazaların (tripsin, kemotripsin və elastaza kimi) spesifikliyi arasındakı fərqləri müəyən edir.
- Fermentlər, serin proteazalarda His-57-nin imidazol qurupunun reaksiyanı kataliz etməsi kimi, bir və ya daha artıq aminturşusunun yan zəncirləri ilə həyata keçirilən turşu-qələvi katalizindən istifadə edirlər. Katalitik qrupların protonlaşmasının pH-dan asılılığı ($\boldsymbol{pK_a}$) çox hallarda fermentin fəallığının pH-dan asılılıq profilində özünü göstərir.
- ***Kofaktorlar*** və ya ***prostetik quruplar*** adlanan, qeyri polipeptid kiçik molekullar və ya ionlar bəzi fermentlərin fəal mərkəzinə birləşə və fermentativ katalizdə əhəmiyyətli

rol oynaya bilirlər. Fermentlərdə olan kiçik üzvi prostetik quruplar, həmçinin ***koenzimlər (kofermentlər***) adlanırlar; ali heyvanların hüceyrələrində sintez oluna bilməyən vitaminlər kofermentlər kimi fəaliyyət göstərirlər və ya kofermentlərin yaranmasında istifadə olunurlar.

- Ümumi metabolik yolda iştirak edən fermentlər eyni hüceyrə bölməsində yerləşirlər və ola bilər ki, bir monomer zülal daxilində domenlər şəkilində, multimer zülalların subvahidləri şəkilində və ya ümumi Skafoldda toplanan zülallar kompleksinin komponentləri şəkilində birləşsinlər (bax Şəkil 3-30).

3.4 Zülalın Funksiyasının Tənzimlənməsi

Hüceyrədəki proseslərin əksəriyyəti öz-özünə müstəqil və ya sabit sürətlə baş vermir. Yaşamaq üçün bütün zülalların və başqa biomolekulların fəaliyyəti onların funksiyalarının normal fəaliyyətə inteqrasiya olunması istiqamətində tənzimlənir. Məsələn, fermentlərin katalitik fəallığı elə tənzimlənir ki, reaksiya məhsullarının miqdarı yalnız hüceyrənin tələbatını ödəyən dərəcədə istehsal olunsun. Nəticədə, substratın və məhsulun sabit-vəziyyətdəki qatılığı hüceyrənin daxili şəraitindən asılı olaraq dəyişir. Qeyri fermentativ zülalların tənzimlənməsi – məsələn, membran kanallarının açılması və bağlanması və ya makromolekulyar komplekslərin toplanması (yığılması) da həmçinin vacibdir.

Ümumiyyətlə, zülalların fəallığını tənzimləmək üçün üç yol vardır. Birincisi, hüceyrələr zülalların sabit-vəziyyətdə səviyyəsini onların ya sintezini artırmaq yolu ilə ya da parçalanma dərəcəsini aşağı salmaqla və ya hər ikisi ilə artıra və ya azalda bilirlər. İkincisi, hüceyrələr zülalların miqdarını dəyişmədən onların daxili fəallığını azalda bilirlər. Məsələn, hüceyrələr kovalent və qeyri kovalent qarşılıqlı əlaqə vasitəsi ilə substrata birləşməyə qarşı affinliyi dəyişə bilir, və ya kiçik zaman müddətində zülallar qeyri fəal konformasiyaya qarşı fəal konformasiyada olurlar. Üçüncüsü, hüceyrə daxilində zülalların özlərinin yerləşməsində və qatılığında, zülalın fəaliyyətinin hədəfində (məsələn fermentlərin substratı), və ya zülalların fəallığı üçün tələb olunan bəzi başqa molekullarda (məsələn. fermentlərin kofaktorları) dəyişilmələr ola bilr. Hər üç tip tənzimləmə hüceyrənin həyatında və fəaliyyətində vacib rol oynayır. Bu bölmədə, biz əvvəlcə zülalların miqdarının tənzimlənməsi mexanizmini müzakirə edirik, sonra isə zülalların fəallığını tənzimləyən kovalent və qeyri-kovalent qarşılıqlı əlaqələrin şərhini veririk.

Zülalların Sintezinin və Parçalanmasının Tənzimlənməsi Hüceyrələrin Fundamental Xassəsidir

Zülalların sintezinin sürəti zülalı kodlaşdıran DNT-nin mRNT-yə çevrilməsi (transkripsiya), hüceyrədə fəal mRNT-nin sabit-vəziyyətli miqdarı və mRNT-nin yeni sintez olunmuş zülala çevrilməsi (translyasiya) sürəti ilə müəyyən edilir. Bu əhəmiyyətli yol Fəsil 5-də ətraflı təsvir olunur.

Hüceyrədaxili zülalların yaşama dövri, mitoz dövründə hüceyrə bölünməsinin mərhələlərini tənzimləyən (bax Fəsil 9) mitoz tsiklinləri kimi zülallarda bir neçə dəqiqədən ibarət olan qısa zamandan, göz qişasında olan zülallar kimi orqanizmin öz həyat dövrü qədər uzun ola bilir. Zülalların həyat dövrü, ilkin olaraq tənzimlənən zülal parçalanması ilə nizamlanır.

Zülalların parçalanmasının hüceyrədə xüsusən iki mühüm rolu vardır. Birincisi, parçalanma potensial zəhərli (toksik) zülalları, düzgün bükülməmiş və ya yığılmamış zülalları, zədələnmiş zülalları, o cümlədən mutasiya olunmuş genlərin məhsullarını, fəal hüceyrə metabolitləri ilə və ya stresslə (məsələn istilik şoku) zədələnmiş zülalları aradan çıxarır. Zülalların çaperonla-həyata keçirilən bükülməsinin baş verməsinə baxmayaraq, yeni hazırlanmış zülallar səhv büküldüyündən tez bir şəkildə parçalanırlar. Bunlar, ona görə baş verir ki, zülalların bükülməsini həyata keçirmək üçün lazım olan çaperonların vaxtında cəlb oluması baş vermir və ya zülalların kompleksdə qüsurlu şəkildə toplanması baş verir. Əksər başqa zülallar çox yavaş parçalanırlar, məməlilərin hüceyrələrində hər saatda zülalların 1-2 faizi parçalanır. İkincisi, başqa halda normal olan zülalların nəzarət olunan parçalanması, nəzarət edilən sintez dərəcələri ilə birlikdə, zülalların və onların fəaliyyətinin müvafiq səviyyələrinin saxlanılması və bu səviyyələrdə hüceyrələrin dəyişən şəraitlərə cavab verməsinə kömək etmək üçün sürətli dəyişikliklərə imkan verən çox güclü bir mexanizmi təmin edir.

Eukariot hüceyrələrdə zülalları parçalamağın bir neçə yolu var. Əsas yollardan biri, turş daxili mühiti (pH~4.5) çoxsaylı hidrolitik fermentlərlə dolu olan, membranla əhatə olunmuş orqanoid lizosomlarda fermentlərlə parçalanmadır. Lizosomlarla dağıdılma əsasən hüceyrənin **avtofaqiya** adlanan proseslə yaşlı və ya qüsurlu orqanoidlərinin dağıdılmasına (bax Fəsil 14) və hüceyrələr tərəfindən qəbul olunmuş hüceyrəxarici zülalların dağıdılmasına yönəlmişdir. Lizosomlar sonrakı fəsillər boyu müzakirə olunacaq. Biz burada diqqətimizi başqa bir əhəmiyyətli yola: məməlilərin hüceyrələrində ümumi zülal dağılmasının 90 faizinin baş verdiyi, zülalların sitoplazmada proteasomlarla dağıdılmasına yönəldəcəyik.

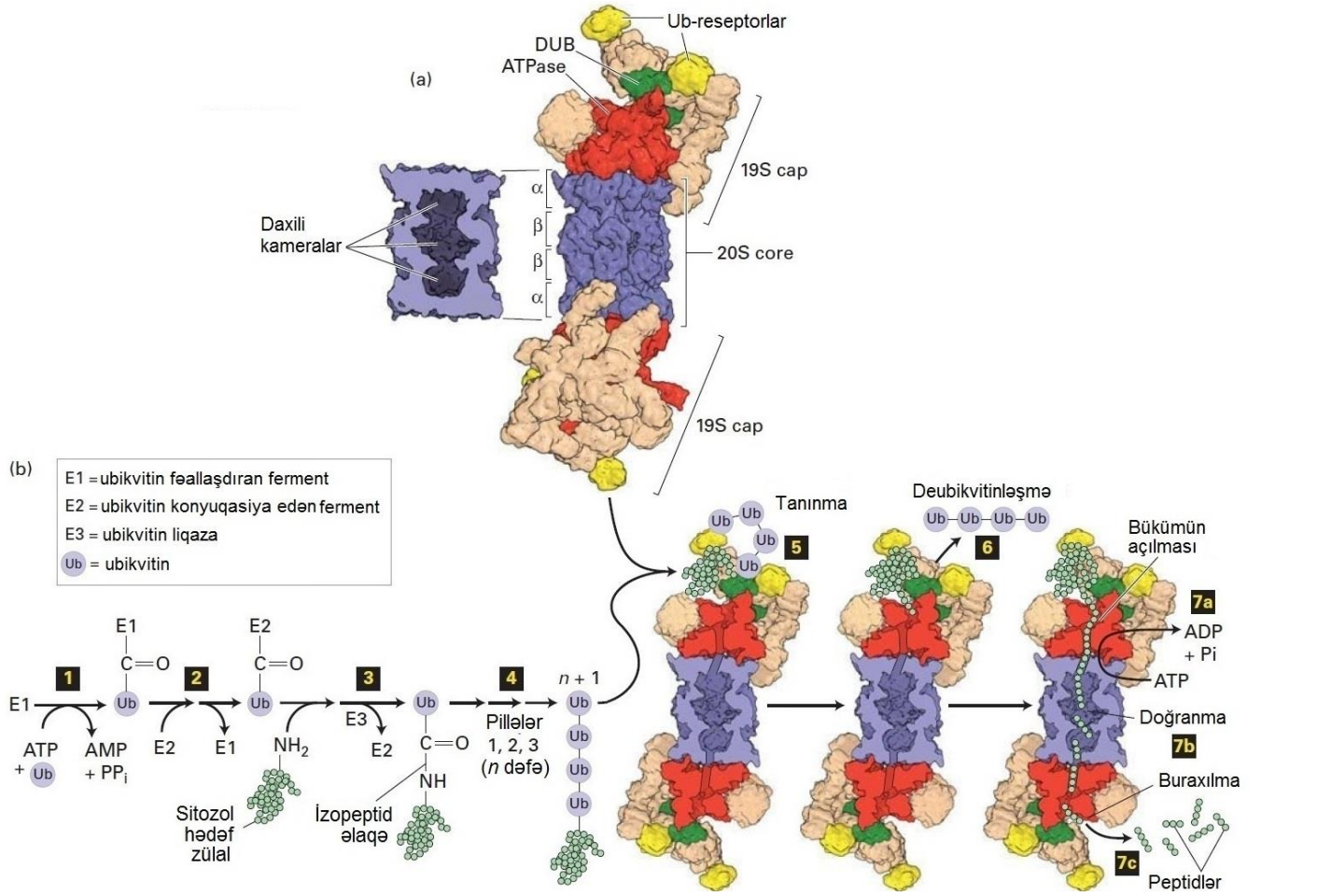
Proteasom Zülalların Parçalanması Üçün Istifadə Olunan Molekulyar Maşındır

Proteasomlar çox böyük, zülal-parçalayan makromolekulyar maşınlar olub hüceyrənin çoxsaylı müxtəluf funksiyalarında, o cümlədən hüceyrə tsikli (bax Fəsil 19), transkripsiya, DNT reparasiyası (bax Fəsil 5), hüceyrənin proqramlaşdırılmış ölümü və ya **apoptoz**, (bax Fəsil 21), başqa orqanizmlər tərəfindən olan yoluxmanın tanınması və cavab reaksiyası (bax Fəsil 23) və səhv bükülmüş zülalların aradan çıxarılması kimi proseslərdə fəaliyyət göstərirlər. Tipik məməli hüceyrəsində təxminən 30000 qədər proteasom vardır.

Proteasomlar təxminən ~60 subvahiddən təşkil olunub və molekulyar çəkisi 2.4×10^6 Da bərabərdir. Proteasomlar 20S proteasom (burada S Svedberq vahidi olub hissəciyin sedmentasiya xüsusiyyətinə əsaslanır və onun ölçüsünə proporsionaldır) adlandırılan silindirik, çəlləyə-bənzər katalitik özəyə (Şəkil 3-31a) və təxminən 14.8 nm hündürlüyə və 11.3 nm diametrə malikdir. Bu özəyin uclarına birləşmiş bir və ya iki 19S qapaq komplekslər 20S katalitik özəyin fəallığını tənzimləyir. Özək və qapaqlardan biri və ya hər ikisi bir yerə yığılıb kompleksi yaradanda onlar, hətta iki-papağa-malik kompleks daha böyük olsa da (30S) birlikdə *26S kompleks* hesab edilir. 19S qapaq 19 zülal subvahidindən ibarətdir, onlardan altısı ATP hidroliz etmək qabiliyyətinə malikdir (başqa sözlə desək onlar

AAA-tip ATP-azalara aiddirlər) və bu yolla zülal substratların bükülməsini açmaq və onları selektiv şəkldə proteasomun katalitik özəyinin daxili kamerasına ötürmək üçün lazım olan enerji ilə təmin edirlər. Maya göbələyi üzərində aparılan genetik tədqiqatlar göstərmişdir ki, hüceyrələr funksional proteasomlar olmadan yaşaya bilmirlər, bu da onların vacibliyini göstərir. Hətta, düzgün proteasomal fəallıq o qədər mühümdir ki, hüceyrələr zülalın sintezi üçün sərf olunan enerjinin 30 faizi qədər enerjini onların proteasomlarda parçalanmasına sərf edirlər.

20S proteasomal katalitik özək hər biri yeddi β subvahiddən ibarət olan iki daxili halqadan təşkil olunmuşdur və hər halqada üç proteolitik fəal mərkəz üzü daxili kamerasının diametrdə ~1.7 nm olan çəlləyin içərisinə tərəf yerləşmişdir, hər biri yeddi α subvahidin əmələ gətirdiyi iki bayır halqalarr (Şəkil 3-31a) isə 19S qapaq vasitəsilə açılan kanalla daxil olan subst-



ŞƏKİL 3-31 Ubikvitin və proteasomlar vasitəsilə həyata keçirilən proteoliz. *(a) Sağda:* 26S proteasom silindirik quruluşa malik olub, 20S özəyin bir və ya hər iki tərəfində 19S qapaq vardır. 19S qapağın ondoqquz müxtəlif subvahidinə (çoxsaylı rənglərlə göstərilir) heteroheksamer halqa daxilində toplanmış altı AAA-ATP-aza subvahidləri (Rpt1-6, qırmızı), iki ubikvitin (Ub) reseptor (Rpn10 və Rpn13, sarı) və təkamülə görə ona yaxın olan öz oxşarı Rpn8 ilə heterodimer əmələ gətirən deubikvitinaza fermenti (DUB, Rpn11, yaşıl) daxildirlər. Bundan başqa 19S qapaqda skafoldinq və başqa zülallar da vardır (sarı-darçını). Gstərilən iki 19S qapaq səhifə müstəvisinə nisbətdə bir-birindən əks istiqamətlərə baxırlar. 20S özək dörd birbirinə yapışmış heptamer halqadan ibarətdir (~110 Å diametr × 160Å uzunluq), hər biri ya α (xarici halqa) ya da β (daxili halqa) subvahidlərdən (mavi) təşkil olunub. *Solda*: 20S özəyin kəsilib ayrılmış görünüşü daxili kameranı göstərir. Protreoliz özəyin β halqalarla əmələ gəlmiş mərkəzi daxili kamerasında baş verir. (b) Poliubikvitinləşmə vasitəsilə parçalanmaya hədəf olunan zülallar. E1 fermenti ubikvitin (Ub) molekulunun ATP-dən asılı olan qoşulması ilə (pillə 1) fəallaşır və sonra bu Ub molekulunu E2 fermentin sistein qalıqlarına ötürür (pillə 2). Ubikvitin-liqaza (E3) E2 fermentinə birləşmiş Ub molekulunu hədəf zülalın lizin qalığının yan zəncirinin – NH_2 qrupuna ötürüb birləşmiş isopeptidi əmələ gətirir (pillə 3). Əlavə Ub molekulları Ub ilə modifikasiya olunmuş hədəf zülala isopeptid əlaqələri ilə əvvəlcə birləşdirilmiş Ub molekuluna pillə 1-3-ü təkrar etməklə birləşdirilir və poliubikvitin zənciri əmələ gəlir (pillə 4). Poliubikvitinləşmiş hədəf proteasomun qapağında olan Ub reseptor tərəfindən tanınır (pillə 5) və deubikvitinaza fermentindən istifadə edilərək Ub qrupları uzaqlqşdırılır (pillə 6). Pillə 7-də ATP-nin hidrolizi altı zülalla (heksamer) ATP subvahidlərinə (qırmızı) imkan verir ki, substratın bükülməsini açsın və açılmış zülalı hidroliz etmək üçün 20S özəyin daxili proteoliz kamerasına keçirsin (pillə 7a), bəzi hallarda bu pillə 6 ilə koordinasiya olunmuş şəkildə baş verir, zülal kiçik peptidlərə doğranır (pillə 7b), sonra isə hidroliz olunmuş qısa peptid fraqmentləri oradan buraxılır (pillə 7c). [(a) hissəsi nəzakətlə Antje Aufderheide and Friedrich Foerster tərəfindən, verilənlər P. Unverdorben et al., 2014, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **111**:(15):5544–5549, PDB ID 4cr2.]

ratın tutulub qəbul olunmasına nəzarət edir. Proteasomlar zülalların çoxunu əsaslı şəkildə parçalaya bilirlər, çünki hər bir β subvahid halqada olan üç fəal mərkəz peptid əlaqələrini hidrofob qalıqlardan, turş qalıqlardan və ya əsasi qalıqlardan kəsə bilirlər. Polipeptid substratlar kameraya xarici α subvahidin ortasında olan və tənzimlənən, ~1.3-nm-diametrli deşiklərdən keçməlidir. 26S proteasomda dar olan və çox hallarda yalnız bükülməmiş zülalların daxil olmasına imkan yaradan bu deşiklərin açılması 19S qapaqdakı ATP-aza ilə nizamlanır. Bu ATP-azalar substrat zülalın selektiv birləşməsini və onun bükümünün açılmasını və bükülməmiş polipeptidlərin daxili kameranın içərisinə translokasiyasını təmin edir (Şəkil 3-31b, *aşağıda sağda*). Proteasomal kəsilmənin məhsulu olan qısa peptidlər (2-24 qalıq uzunluqda) kameradan çıxır və sonra sitozol peptidazalar vasitəsi ilə sürətlə parçalanırlar və sonda fərdi ("sərbəst") amin turşularına çevrilirlər. Tədqiqatçılardan biri məcazi mənada belə demişdir ki, "proteasomlar hüceyrənin əcəl kameralarıdır", burada zülallar "minlərlə kəsilmə nəticəsində ölürlər".

Proteasomların ingibitorlarının fəaliyyəti müalicə prosesində və laboratoriyalarda istifadə oluna bilər. MG132 kimi kiçik molekullu proteasom ingibitorları laboratoriyalarda proteasomlarla parçalanmanı blok etmək üçün və proteasomların rolunu qiymətləndirmək və aşağıda göründüyü kimi geniş müxtəliflikdə proseslərdə poliubikvitinləşməni öyrənmək üçün istifadə edilir. Başqa kiçik-molekullu proteasom ingibitorları müalicə məqsədi ilə istifadə olunur. Proteasomlar-vasitəsilə hüceyrədə zülalların parçalanmasının qlobal əhəmiyyətinə görə, proteasomların tam və davamlı şəkildə ingibirləşməsi hüceyrənin ölümünə səbəb olur. Amma, proteasomların qısa intervalda qismən ingibirləşməsi xərçəng xəstəliyinin kimyəvi müalicəsi (kemoterapiya) üçün, xüsusən də anticism-(immunoqlobulin)-istehsal edən hüceyrələrin anormal proliferasiyasının daxil olduğu xərçəng xəstəliyi olan çoxsaylı myelomaları müalicə etmək üçün bir yanaşma kimi təqdim olunmuşdur. Myeloma hüceyrələri anormal dərəcədə yüksək miqdarda potensial zəhərli (toksik), yolunu azan (aberrant) immunoqlobulin polipeptid zəncirlərini istehsal edir, bunlar proteasomlar tərəfindən parçalanır. Xərçəng hüceyrələrində proteasomların ingibirləşməsi bu hüceyrələr daxilində zəhərli, düzgün bükülməmiş immunoqlobulin polipeptidlərin yığılıb toplanmasına və beləliklə hüceyrənin ölümünə səbəb olur. Bundan başqa myeloma hüceyrələrinin yaşaması və artması üçün normal halda NF_kB adlanan tənzimləyici zülalın çox güclü fəallığı (bax Fəsil 16) və eləcə də başqa, buna bənzər "pro-yaşama" ("prosurvival") və "pro-proliferasiya" zülallarının olması tələb olunur. Öz növbəsində, NF_kB yalnız o zaman tam fəaliyyət göstərərək hüceyrənin yaşamasını dəstəkləyə bilir ki, onun ingibitoru *I-$_kB$* ondan ayrılaraq proteasomlar tərəfindən parçalanır (bax Fəsil 16). Proteasomal fəallığın, kiçik molekullu ingibitor dərmanla qismən ingibirləşməsi *I-$_kB$* səviyyəsinin artmasına və uyğun olaraq NF_kB fəallığının azalmasına səbəb olur (bu da müdafiə fallığının itməsi ilə nəticələnir). Bunun nəticəsində xərçəng hüceyrələri daha az proliferasiya uğrayırlar və apoptozla ölürlər. Beləliklə, çoxsaylı myeloma hüceyrələri normal hüceyrələrə nisbətən proteasomal ingibitorlara daha həssasdırlar. Nəticə etibarı iıə, proteasom ingibitorların xərçəng hüceyrələrini öldürə bilən, amma normal hüceyrələri öldürməyən səviyyədə *nəzarət olunan adminstrasiyası*, çoxsaylı müxtəlif myelomaların müalicəsi üçün təsirli və səmərəli müalicə (terapiya) vasitəsi kimi təsdiq olunmuşdur.

Ubikvitin Sitozolda Zülalları Proteasomlarda Parçalanmaq Üçün Nişanlayır.

Əgər proteasomlar yalnız qüsurlu zülalları, ya da atılması planlaşdırılmış zülalları tez parçalayırlarsa, deməli onlar parçalanması planlaşdırılan və planlaşdırılmayan bü zülalları bir-birindən fərqləndirməlidir. Hüceyrələr parçalanması planlaşdırılan belə zülalları onlara 76 a.t. qalığından ibarət olan, və mayadan insana qədər konservativ olaraq saxlanılan, ***ubikvitin*** (Ub) adlandırılan xətti polipeptid molekulunun çox saylı nüsxəsini birləşdirməklə nişanlayırlar. Belə "poli-ubikvitin quyruq" hüceyrədə zülalları proteasomlarda dağıdılmaq üşün nişanlayaraq "ölümü öpmək" xidmətini yerinə yetirirlər. Ubikvitinləşmə prosesi (Şəkil 3-31b, pillə 1-3) üç müxtəlif mərhələdə baş verir:

1. Ubikvitin molekulunun əlavə edilməsi ilə ***ubikvitin-fəallaşdıran fermentin*** (*E1*) fəallaşması, reaksiya ATPnin iştirakını tələb edir;

2. Ubikvitin molekulunun ***ubikvitin-konyuqasiya-edən-fermentin*** (*E2*) sistein qalığına keçirilməsi;

3. E2 fermentinə birləşmiş ubikvitinin C-sonluqlu qlisin-76 qalığının karboksil qrupu ilə hədəf zülalın lizin qalığının yan zəncirinin amin qurupu arasında kovalent əlaqənin əmələ gəlməsi, reaksiya ***ubikvitin-protein-liqaza*** (*E3*) fermenti ilə kataliz olunur. Bu tipli əlaqə ***izopeptidil əlaqəsi*** adlandırılır, çünki o, kovalent rabitə ilə, α amin qrupunun karboksil qrupuna deyil yan zəncirin amin qurupuna birləşmişdir. Ardınca gələn liqaza reaksiyası əlavə edilmiş ubikvitin molekulundakı C-sonluqlu qlisini izopeptid əlaqəsi vasitəsilə əvvəlcə əlavə edilmiş ubikvitindəki lizin 48-in yan zəncirinə kovalent birləşdirərək hədəf zülala kovalent birləşmiş poliubikvitin zəncirini əmələ gətirir. (Biz tezliklə başqa lizin yan zəncirləri ilə ubikvitin əlaqələrini müzakirə edəcəyik.)

Ümumiyyətlə, dörd və ya daha artıq ubikvitinin ubikvitin zəncirində birləşdirilməsinin ardınca 26S proteasomun 19S tənzimləyici qapağı (bir çox hallarda aksessor - köməkçi zülalların köməyi ilə) öz Ub reseptorlarından istifadə edərək poliubikvitin-nişanlanmış zülalı tanıyır (bax Şəkil 3-31a), ATP-azadan istifadə edərək onun bükümünü açır və parçalanmaq üçün onu proteasomun daxilinə ötürür. Poliubikvitinləşmiş substratın bükümü açılan kimi və proteasomun özək nahiyəsinə keçən kimi, **deubikvitinaza** adlandırılan ferment (Dubs) hər bir fərdi ubikvitinlə hədəf zülal arasındakı əlaqələri hidroliz edir və azad olmuş ubikvitinləri, hədəf zülalların yeni dövir modifikasiyası üçün yenidən təkrar istifadəyə göndərir (bax Şəkil 3-31b). İnsanın genom ardıcıllığının oxunması təxminən ~90 müxtəlif Dubs olduğunu göstərir və bunların demək olar 80 faizində, əvvəllər təsvir olunan serin proteazalarda olduğu kimi katalitik üçlükdə sestein qalığından istifadə olunur (sisteinin yan zıncirindəki sulfhidril serinin yan zəncirindəki hidroksil qrupunu əvəz etmək üçün istifadə edilir). Bəzi Dubs-larda katalitik reaksiya zamanı sinkin olması reaksiyanın əsas iştirakçısı kimi vacibdir.

Parçalanmanın Spesifikliyi Xüsusi zülalların proteasomlarda parçalanmaya hədəf olunması ilkin olaraq E3 liqazanın substrat spesifikliyi ilə həyata keçirilir (bax Şəkil 3-11b, pillə 3). Onların əhəmiyyətinin xəbərçisi kimi, göstərmək lazımdır ki, insan genomunda 600-dən artıq güman olunan ubikvitin liqaza geni vardır. Məməlilərin hüceyrələrində çox sayda E3 liqazalar, poliubikvitinləşməsi planlaşdırılan geniş müxtəliflikdə olan zülalların lazım olan anda modifikasiya olunmasını həyata keçirə bilirlər. Bəzi E3 liqazalar, bükülməmiş və ya səhv bükülmüş zülalları tanıyan çaperonlarla birləşirlər; məsələn, E3 liqaza CHIP Hsp70 üçün ko-çaperondur. Bunlar və başqa zülallar (ko-çaperonlar, eskort faktorları, adaptorlar), yenidən düzgün bükülə bilməyən, və parçalanmaq üçün proteasomlara daşınması mümkün olmayan səhv fəaliyyətli zülalların E3-liqaza ilə kataliz olunan poliubikvitinləşməsinin vasitəçisi olurlar. Belə hallarda, çaperon-ubikvitinləşmə-proteasom sistemi zülalların keyfiyyətinə nəzarət sistemi kimi fəaliyyət göstərir.

Keyfiyyət nəzarətindən əlavə, ubikvitin-proteasom sistemi hüceyrənin çox əhəmiyyətli zülallarının fəaliyyətinin (və ya fəallığının) tənzimlənməsində istifadə olunur. Hüceyrə tsiklinə nəzarət edən, tsiklinlər adlanan zülalların parçalıanmasının tənzimlənməsi buna bir misaldır (bax Fəsil 19). Tsiklinlər daxili Arg-X-X-Leu-Gly-X-Ile-Gly-Asp/Asn (X istənilən amin turşusu ola bilər) ardıcıllığına malikdirlər, və xüsusi ubikvitinləşdirici ferment kompleksi tərəfindən tanınırlar. Hüceyrə tsiklinin xüsusi anında hər bir tsiklin molekulu tsiklin-kinaza ilə fosforlaşır. Guman olunur ki, bu fosforlaşma taninma ardıcıllığını ubikvitinləşdirici fermentlərin təsirinə məruz qoyan konformasiya dəyişikliyinə və nəticədə poliubikvitinləşməyə və proteasomal parçalanmaya səbəb olur.

Ubikvitin və Ubikvitin-Əlaqəli Molekulların Başqa Funksiyaları Ubikvitinlərin bir neçə çox yaxın oxşarı onlar kimi akseptor substratların fəallaşmasında və ötürürlməsində E1-, E2- və E3-dən asılı olan mexanizmlərdən istifadə edirlər. Bu ubikvitinə-bənzər modifikasiyalar Sumo ilə tənzimlənən nüvəyə daşınmalar kimi çox müxtəlif prosesləri, ubikvitinə-bənzər modifikator Atg8/LC3 ilə tənzimlənən avtofaqiyanı (bax Fəsil 14) nizamlayır. Ubikvitinin hədəf zülala qoşulması (birləşməsi) zülalların parçalanmaq üçün nişanlanmasından başqa, bu fəsildə sonra müzakirə edəcəyimiz, digər proseslərdə də istifadə oluna bilir və bunların bəzilərinə Lis-48-dən başqa digər poliubikvitin əlaqələri də daxildir.

Ubikvitinləşmə kimi, deubikvitinləşmə də proteasomla-həyata keçirilən zülal parçalanmalarından başqa digər proseslərə daxildir. Geniş-miqyaslı, mass-spektrometriyaya-əsaslanan və bu fəsildə sonra təsviri verilmiş "proteomik" metodları çox məharətli kompüter yanaşmaları ilə birlikdə göstərmişdir ki, çox hallarda multizülal komplekslərinə birləşən Dubs, həddən artıq geniş sırada hüceyrə proseslərində iştirak edir. Bu hüceyrə bölünməsindən və hüceyrə tsikli nəzarətindən başlayaraq (bax Fəsil 19) hüceyrə siqnal yollarına (bax Fəsil 15 və 16), membran daşınmalarına (membrane trafficking) (bax Fəsil 14) qədər geniş sahədə dəyişilir.

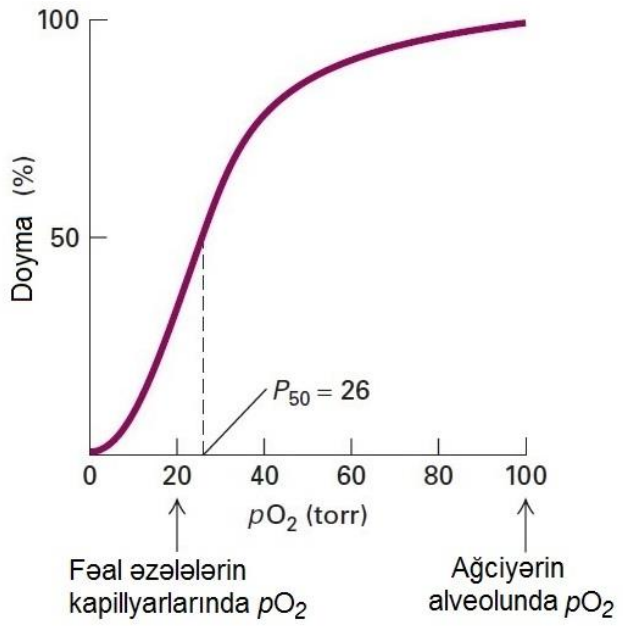
Qeyri-kovalent Birləşmələr Zülalların Kooperativ və ya Allosterik Ttənzimlənməsinə İmkan Verir.

Zülalların miqdarının tənzimlənməsindən başqa, hüceyrələr həmçinin zülalların daxili fəallıqlarını da tənzimləyir. Zülalların funksiyasını tənzimləmək üçün əhəmiyyətli mexanizmlərdən biri allosterik qarşılıqlı təsir yoludur. Geniş mənada allosteriya (Yunan sözü olub "başqa forma" mənasını verir) zülalların üçüncü və ya dördüncü quruluşunda, və yaxud hər iki quruluşunda liqandın qeyri-kovalent birləşməsi ilə induksiya olunan istənilən dəyişikliklər aid edilir. Liqand zülalın bir mərkəzinə (A) birləşərək onun konfarmasiya dəyişməsini və ona bitişik olan başqa bir mərkəzin (B) fəallığını induksiya edərkən liqand zülalın ***allosterik effektoru*** adlanır, bu zaman A mərkəzi a***llosterik birləşmə mərkəzi***, zülal isə ***allosterik zülal*** adlanır. Təyinatına görə, allosterik zülallar çoxsaylı birləşmə mərkızinə malikdirlər, ən azı bir mərkəz allosterik effektor üçün və ən azı bir mərkəz zülalın qarşılıqlı təsirdə olacağı başqa molekul üçün olur. Allosterik dəyişmələr fəallıqda müsbət və ya mənfi ola bilir. Mənfi allosterikliyə, çox hallarda, çoxmərhələli biokimyəvi yolların son məhsulu daxil olur və bu məhsul yolun erkən mərhələlərini kataliz edən fermentə birləşərək onun fəallığını azaldır. Bu yolda məhsulun həddindən artıq toplanmasına mane olunur. Metabolik yolun bu cürə tənzimlənməsi ***son-məhsulun-ingibirləşməsi*** və ya ***geriyə-əlaqə-ingibirləşmə*** (***feedback-inhibition***) adlanır. Allosterik tənzimlənmələr xüsusən multimer fermentlərdə və bir subvahidin konformasiya dəyişikliyinin başqa yaxın olan digər subvahidin konformasiyasına ötürüldüyü başqa zülallarda geniş yayılmışdır.

Kooperativlik çox hallarda allosterikliyə sinonim termin kimi istifadə olunur və adətən liqandın bir mərkəzə birləşməsinin *eyni tipli* liqandın başqa molekulunun başqa bir mərkəzə birləşməsinə olan təsiri (müsbət və ya mənfi) hesab olunur. Hemoqlobin zülalları müsbət kooperativ birləşmənin klassik nümunəsidir, belə ki, vahid liqand, molekulyar oksigenin (O_2) birləşməsi növbəti oksigen molekulunun birləşməsinin affinliyini artırır. Hemoqlobində dörd subvahidin hər biri bir hem molekuluna malikdir. Hemoqlobində hem qrupu oksigen birləşdirən komponentdir (bax Şəkil 3-14a). Dörd hemoqlobin subvahidlərindən birində oksigenin hem molekuluna birləşməsi lokal konformasiya dəyişikliyini induksiya edir və bunun təsiri başqa subvahidlərə də yayılır, başqa oksigen molekullarının qalan hem qruplarına birləşməsinin K_d-sini azaltmaqla onların affinliyini artırır və siqmoidal oksigen-birləşdirmə əyrisini əmələ gətirir (Şəkil 3-32). Oksigenin doyma əyrisi siqmoidal formada olduğuna görə, hemoqlobində oksigen birləşdirmə mərkəzlərinin faizlə doyma vəziyyətinin 10 faizdən 90 faizə qədər qalxması üçün oksigenin qatılığı yalnız dörd dəfə artır. Bunun əksinə, əgər kooperativlik olmasaydı və əyrinin forması Mixayles-Mentendəki tipik formada olsaydı (bax Şəkil 3-24) və ya qeyri-kooperativ birləşmə olsaydı, o zaman hemoqlobində belə bir oxşar faiz artımının alınması üçün oksigenin qatılığının artması 81 dəfə çox olmalı idi. Belə bir kooperativlik hemoqlobinə imkan verir ki, oksigenin qatılığının yüksək olduğu ağciyərdə oksigeni çox səmərəli şəkildə götürsün, oksigenin qatıllığının şox aşağı olduğu toxumalarda onu buraxsın. Beləliklə kooperativlik, sistemin həssaslığını liqandın qatılığının dəyişməsinə görə artırır (amplifikasiya edir) və çox hallarda təkamüldə selektiv üstünlükləri təmin edir.

Kalsium və GTP-nin Qeyri Kovalent Birləşməsi Zülalların Fəallığına Nəzarətdə Allosterik Keçiricilər Kimi Geniş İstifadə Olunur

Hemoqlobinin fəallığında allosterik dəyişikliklərə səbəb olan oksigendən fərqli olaraq, bəzi başqa allosterik effektorlar onlara qeyri kovalent birləşməklə çoxsaylı müxtəlif zülalların fəallığını işə salaraq və ya dayandıraraq keçiricilər kimi fəaliyyət göstərirlər. Bu kitab boyunca təkrar-təkrar rast gələcəyimiz, xüsusən də hüceyrə siqnal yolları kontekstində çox rast gəlinəcək iki mühüm allosterik keçiricilər (bax Fəsil 15 və 16) Ca^{2+} və GTP-dirlər.



EKSPERIMENTAL ŞƏKIL 3-32 Hemoqlobin oksigeni kooperativ olaraq birləşdirir. Hər bir tetramer hemoqlobin zülalı dörd oksigen birləşdirən mərkəzə malikdir, doyma halında bütün mərkəzlər oksigenlə yüklənirlər. Toxumalarda oksigenin qatılığı adətən parsial təzyiqlə (pO_2) torr vahidi (təzyiqin standart şərait altında 1mm civəyə ekvivalent standart ölçüsü) ilə ölçülür. P_{50}, verilmiş hemoqlobin qatıllığında oksigen-birləşdirən mərkəzin yarısının tutulduğu pO_2-dir; bu hardasa, fermentativ reaksiyadakı K_m-in analoqudur. pO_2-nin kiçik qiymətlərində birləşmiş oksigenin miqdarındakı böyük dəyişiklik, əzələ kimi periferial toxumalatrda oksigenin səmərəli şəkildə buraxılmasına imkan yaradır. Liqandın qatılığına qarşı faizlə doyma əyrisinin siqmoidal forması kooperativ birləşmənin olduğunu göstərir, bir molekul oksigenin birləşməsi allosterik olaraq sonrakı oksigen molekullarının birləşməsinə təsir edir. Kooperativ birləşmə olmayan halda, birləşmə əyrisi, Şəkil 3-24-də olduğu kimi, hiperbola formasında olacaqdır. Bax J.M. Berg et al., 2015, *Biochemistry*, 8th ed.Macmillan.]

Ca^{2+}/Kalmodulin vasitəçiliyi keçid Sitozolda sərbəst Ca^{2+}-un (sudan başqa digər molekullarla birləşməyən) qatıllğı, xüsusi membran nəqliyyat zülalları vasitəsi ilə artıq Ca^{2+}-un fasiləsiz şəkildə sitozoldan kənara vurulması yolu ilə çox aşağı səviyyədə ($\sim 10^{-7}$M) saxlanılır (bax Fəsil 11 və 15). Amma, bizim Fəsil 11 və 15-də öyrənəcəyimiz kimi, hüceyrə səth membranlarında Ca^{2+}-keçirici kanalların açılması və hüceyrəxarici Ca^{2+} ionlarının hüceyrə daxilinə axması nəticəsində sitozolda Ca^{2+} qatılığı 10 dəfədən 100 dəfəyə qədər arta bilir. Sitozol Ca^{2+} ionlarının bu cürə artması, xüsusi Ca^{2+}-birləşdirən zülallar tərəfindən hiss edilir, sonuncu isə başqa zülalların fəallığını işə salmaq və ya dayandırmaqla hüceyrənin hərəkətini (və ya davranışını) dəyişir. Hüceyrəxarici Ca^{2+}-un hüceyrənin fəaliyyəti üçün əhəmiyyətini ilk dəfə sənədləşdirən 1883-cü ildə S. Ringer olmuşdur, o ayrılmış siçovul ürəyini, Londonun "ağır" (Ca^{2+} ilə zəngin) kəmər sularında hazırlanmış NaCl məhluluna saldıqda çox gözəl döyünmüşdür, amma əksinə distillə suyunda hazırlanmış NaCl məhluluna saldıqda çox zəif döyünmüş və tez də dayanmışdır.

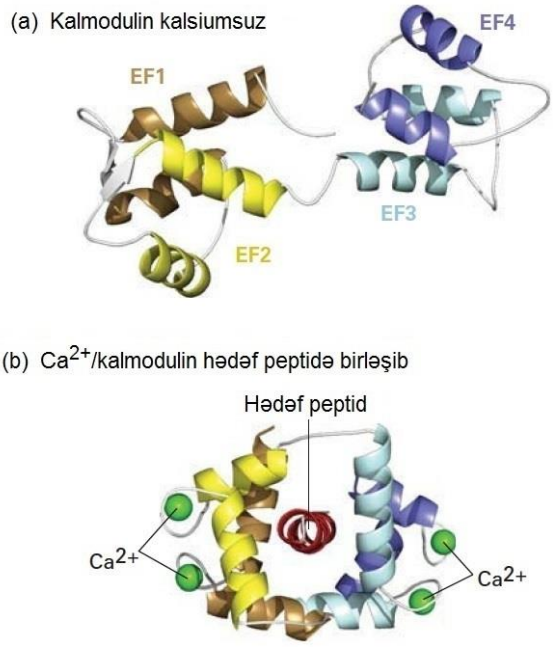
Çox Ca^{2+}-birləşdirən zülallar Ca^{2+}-u yuxarıda müzakirə olunmuş EF əl/spiral-ilgək-spiral quruluş motifini istifadə etməklə birləşdirirlər (bax Şəkil 3-10b). Çox yaxşı öyrənilmiş EF əl zülal, kalmodulin, bütün eukariot hüceyrələrdə tapılmışdır və həm vahid monomer zülal şəkilində, həm də multimer zülalın subvahidi kimi mövcud ola bilir. Qantel-formalı molekul, kalmodulin, K_d-ləri $\sim 10^{-6}$M olan dörd Ca^{2+}-birləşdirən EF ələ malikdir. Ca^{2+}-un kalmodulinə birləşməsi onda konformasiya dəyişilməsinin yaranmasına səbəb olur və bu dəyişiklik Ca^{2+}-kalmodulinə, müxtəlif hədəf zülalların təkamül prosesində saxlanmış konservativ ardıcıllıqlarına birləşməsinə imkan verir (Şəkil 3-33), bu yolla onların fəallığının başlanmasını və ya dayandırılmasını həyata keçirir. Beləliklə, kalmodulun və ona bənzər digər EF əl zülallar Ca^{2+}-un miqdarının dəyişilməsi ilə həyata keçirilən funksiya ilə başqa zülalların fəlliyyətini modulyasiya edərək ***keçirici (dəyişən) zülallar*** kimi fəaliyyət göstərirlər.

Quanin-Nukleotid-Birləşdirən Zülalların Vasitəçiliyi İlə Baş Verən Keçiricilik Hüceyrədaxili keçirici zülalların başqa bir qrupu **GTP-aza superailəsini** əmələ gətirirlər. Adlarından göründüyü kimi, bu zülallar fermentdirlər, GTP-azadırlar, bunlar GTP-ni (quanozin trifosfatı) GDP-ə (quanozin difosfata) hidroliz edirlər. Bunların sırasına, qurulyşu Şəkil 3-9-da GTP birləşmiş vəziyyətdə (birləşmiş GTP mavi rəngdədir) göstərilən monomer Ras zülalar, və trimer G zülallarda olan G_α subvahidlər daxildirlər, hər ikisi 15 və 16-cı fəsillər boyunca müzakirə olunur. Həm Ras həm də G_α hüceyrədə siqnal sistemində fəaliyyət göstərərkən plazma membranına birləşə bilirlər, və hüceyrənin proliferasiyasında və differensasiyasında mühüm rol oynayırlar. GTP-aza superailəsinin başqa nümayəndələri zülal sintezində, zülalların nüvə və sitoplazma arasında daşınmasında, qabıqlı qovucuqların əmələ gəlməsində və onların hədəf membranla qovuşmasında, və aktin sitoskeletin nizamlanmasında iştirak edirlər. Bəzi GTP-aza zülallarının onlara kovalent qoşulmuş və onların membrana birləşməsində vasitəçi olan lipid zənciri vardır (bax Şəkil 7-19). Biz müxtəlif GTP-aza keçirici zülalların hüceyrədaxili siqnalların tənzimlənməsində və başqa proseslərdə rolunu bir neçə növbəti fəsildə öyrənəcəyik.

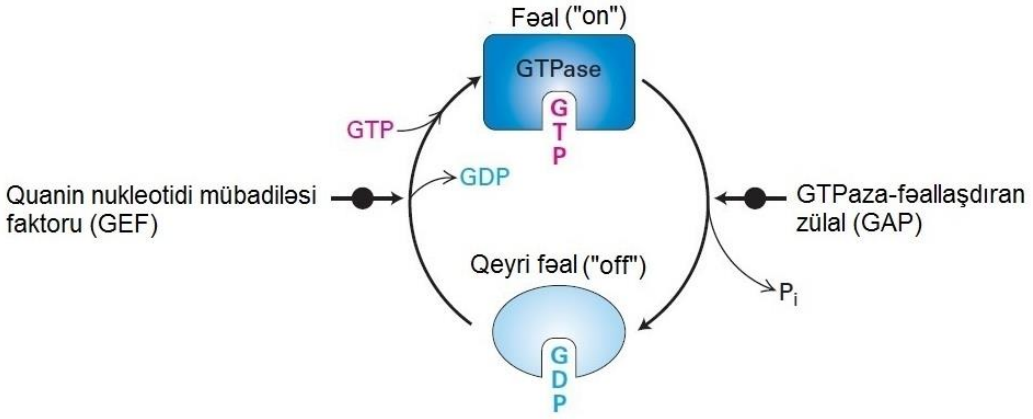
Bütün GTP-aza keçirici zülallar iki formada və ya konformasiyada mövcud olurlar (Şəkil 3-32): (1) GTP birləşmiş fəal ("işləyən") konformasiyada, onlar bu formada xüsusi hədəf zülallara birləşərək onların fəaliyyətinə təsir edə bilirlər, (2) GDP birləşmiş qeyri fəal ("sönmüş") konformasiyada. GTP molekulu zülalda qeyri-fəal vəziyyətdə ona birləşmiş GDP-ni əvəz edəndə keçirici işləyən vəziyyətə keçir və zülalın konformasiyası qeyri-fəal formadan fal formaya dəyişir. Zülalın nisbətən aşağı olan GTP-aza fəallığı ona birləşmiş GTP-ni hidroliz edərək GDP-yə çevirir və konformasiya dəyişikliyini

etməklə zülalı fəal vəziyyətdən qeyri-fəal vəziyyətə çevirərək keçiricini işlməyən vəziyyətə gətirir. Verilmiş istənilən GTP-aza keçiricinin GTP-birləşmiş formada fəal vəziyyətdə olduğu zamanın müddəti, GDP-yə çevrilməsindən əvvəl GTP-nin nə qədər müddətdə birləşmiş vəziyyətdə qalmasından asılıdır. Bu zamanın müddəti, GTP-aza fəallığının sürətindən asılıdır. Beləliklə, GTP-aza fəallığı bu keçiriciyə nəzarət etmək üçün taymer rolunu oynayır. Hüceyrələr müxtəlif zülallara malikdirlər, bunlar verilmiş istənilən GTP-aza keçirici üçün, GTP-aza fəallığının ilkin (və ya əsil) dərəcəsini modulyasiya edə (dəyişdirə) bilir və beləliklə keçiricinin hansı müddətə işləyən vəziyyətdə olmasına nəzarət edir. Hüceyrələr həmçinin xüsusi zülallara malikdirlər və onların funksiyası qeyri-fəal GTP-azanın fəal GTP-azaya çevrilməsini tənzimləməkdir, bu da zülala birləşmiş GDPnin GTP ilə əvəz avəz olunmasını (*GDP/GTP mübadiləsi*) tezləşdirməklə keçiricini işlək vəziyyətə gətirir. Bu zülallara GTP mübadiləsi faktorlar və ya GEF-lər deyilir. Lipid lövbərləri olan GTP-azalar həmçinin quanin nukleotidi dissosasiyası ingibitoru (GDI) adlanan zülallarla tənzimlənirlər, bunlar lipid zəncirə birləşərək hüceyrə membranı ilə qarşılıqlı əlaqəyə təsir edirlər. Biz müxtəlif GTP-aza keçirici zülalların hüceyrədaxili siqnal sisteminin tənzimlənməsində və başqa proseslərdə rollarını sonrakı bir neçə fəsildə oyrənirik.

GAP-lar, GEF-lər və GDI-lar özləri tənzimlənməyə məruz qalırlar və öz GTP-azaları ilə birlikdə geniş sırada hüceyrə fəaliyyətinin komleks tənzimləyici şəbəkələrində iştirak edirlər. Ona görə də çox təccübləndirici deyildir ki, belə incə nizamlanmış tənzimləyici şəbəkənin mutasiya ilə və ya patogenlərlə qırılması geniş müxtəliflikdə xəstəliklərin yaranması ilə nəticələnir. Bu şəbəkəyə təsir edən genetik xəstəliklərə Nuunan sindromu (inkişaf pozuntuları), retinitis piqmentoza (degenerativ göz xəstəliyi), X-əlaqəli zəka geriliyi kimi xəstəliklər daxildirlər. Bu şəbəkənin patogenlərlə qırılmasına bakteriyalarla induksiya olunan qida zəhərlənməsi, dizinteriya (bağırsaqların diareriya ilə iltihablaşması), Legionnari xəstəliyi (ağ ciyər iltihabının daxil olduğu kəskin sətəlcəm tipi) hətta çuma xəstəliyi (buna Qara Ölüm xəstəliyi də deyilir, 1347 və 1351-ci illər arasında Çin əhalisinin ~59 faizinin, Avropa əhalisinin isə ~33 faizinin ölümünə səbəb olan) kimi nümunələr daxildirlər.



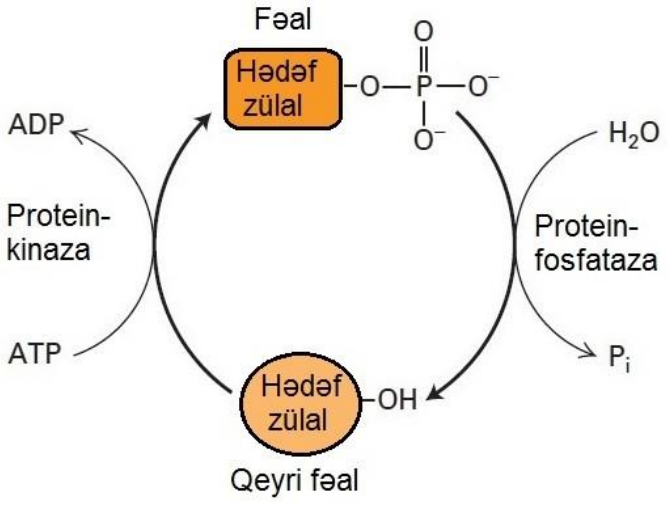
ŞƏKİL 3-33 Ca^{2+}-un kalmodulinə birləşməsi ilə induksiya olunan konformasiya dəyişikliyi. Kalmodulin geniş yayılmış sitozol zülalı olub, hər bir EF al (spiral-ilgək-spiral) motifdə (EF1-EF4, həmçinin bax Şəkil 3-10) hər birinə bir dənə olmaqla dörd Ca^{2+}-birləşdirmə mərkəzinə malikdir. Sitozolda Ca^{2+}-un 5×10^{-7}M-dan yuxarı qatılığında, Ca^{2+}-un kalmodulinə birləşməsi zülalın konformasiyasını qantel-formasından bağlanmamış formaya dəyişir (a), bu formada hidrofob yan zəncirlər məhlula daha çox məruz qalırlar. Əmələ gəlmiş Ca^{2+}-kalmodulin müxtəlif hədəf zülalların təsirinə məruz qalmış spiral ətrafında bükülür (b), bununla da onun fəallığını dəyişir. [(a) hissəsi H. Kuboniwa et al., 1995, *Nat. Struct. Biol.* **2**:768–776, PDB ID 1cfd-dən. (b) hissəsi W. E. Meador, A. R. Means, and F. A. Quiocho, 1992, *Science* **257**:1251–1255, PDB ID 1cdl-dən



ŞƏKİL 3-34 GTP-aza keçirici. GTP-azalar GTP-ə birləşib onu GDP-yə hidroliz edən fermentlərdir. GTP birləşərkən GTP-aza fəal və ya "işləyən" konformasiyanı alır və hədəf zülalla qarşılıqlı təsrdə olaraq onların fəalləğəni tənzimləyə bilir; birləmiş GTP daxili GTP-aza fəallığı ilə hidroliz olunaraq GDP-yə keçir və GDP birləşmiş GTP-aza bu zaman qeyri fəal və ya "işləməyən" konformasiyada olur. GTP-aza fəallığı, GEF (quanin nukleotid dəyişən faktor) adlanan başqa bir zülalın birləşmiş GDP-ni ətraf maye mühitdə olan GTP ilə əvəz olunmasını həyata keçirərkən yenidən fəal və ya "işləyən" konformasiyaya gəlir. GTP-aza fəallaşdıran zülallar, və ya GAP-lar GTP hidrolizinin sürətinə təsir edə bilirlər. GTP-azanın fəal formasının hədəf zülallara birləşməsi qeyri-kovalent tənzimlənmə formasıdır

Fosforlaşma və Defosforlaşma Zülalların Fəallığını Kovalent Tənzimləyir

Yuxarıda təsvir olunan qeyri-kovalent tənzimləmənin istifadəsindən başqa hüceyrələr zülalların daxili fəallıqlarını tənzimləmək üçün kovalent modifikasiyalardan da istifadə edə bilirlər. Zülalın fəallığının tənzimlənməsində çox istifadə olunan ümumi kovalent mexanizmlərdən biri **fosforlaşma** - fosfat qrupunun geriyə dönən şəkildə serin, treonin və ya tirozin qalıqlarının yan zəncirindəki hidroksil qruplarına əlavə edilməsidir. Fosforlaşma **proteinkinazalar** adlanam fermentlərlə kataliz olunur, defosforlaşma (fosforsuzlaşma) kimi məlum olan, fosfor qalığının uzaqlaşdırılması isə **fosfatazalar** tərəfindən həyata keçirilir. Kinaza və fosfatazaların bir-birinin əksinə olan fəaliyyəti müxtəlif zülalların fəallığını işə salmaqla və ya dayandırmaqla "keçiririci" funksiyasını həyata keçirirlər (Şəkil 3-35). Bəzən fosforlaşma mərkəzi keçici olaraq geriyə dönən şəkildə, əlavə tənzimləyici vasitə kimi N-asetilqlükozamin şəkəri ilə kovalent modifikasiya olunmaqla maskalanır (gizlənir). Fosforlaşma zülalın yükünü dəyişərək müəyyən dərəcədə onun səth formasını dəyişir, nəticədə onda konformasiya dəyişikliyinə səbəb olur. Nəticə etibarı ilə, fosforlaşma (və ya defosforlaşma) zülalın hüceyrə daxilində yerləşməsinə (məsələn, onun membranın daxili səthinə yapışmasına), onun daxili (məsələn, fermentativ) fəallığına, başqa molekullara, o cümlədən metabolitlərə, DNTyə, və ya başqa zülallara birləşmək qabliyyətinə, və ya onun stabillik qabliyyətinə (parçalanma dərəcəsinə) təsir edə bilir. Bundan başqa, SH2 domenlər kimi (bax Şəkil 16-11), bir sıra konservativ zülal domenləri xüsusi olaraq fosforlaşmış peptidlərə birləşirlər. Beləliklə fosforlaşma, bu kitabın müxtəlif fəsillərində müzakirə olunmuş, geniş miqdarda müxtəlif hüceyrə fəaliyyətini əmələ gətirən və ya onu məhv edən zülal komplekslərinin formalaşmasında vasitəçi rolunu oynayır.



ŞƏKİL 3-35 Zülalların fəallığının fosforlşma və defosforlaşma yolu ilə tənzimlənməsi. Zülalların tsiklik fosforlaşması və defosforlaşması, zülalların fəallıqlarının tənzimlənməsi üçün ümumi hüceyrə mexanizmidir. Bu nümunədə, hədəf zülal fosforlaşan zaman fəal (*yuxarıda*), defosforlaşan zaman isə qeyri fəaldır (*aşağıda*), bəzi zülalların fosforlaşmaya cavabı əksinə olur.

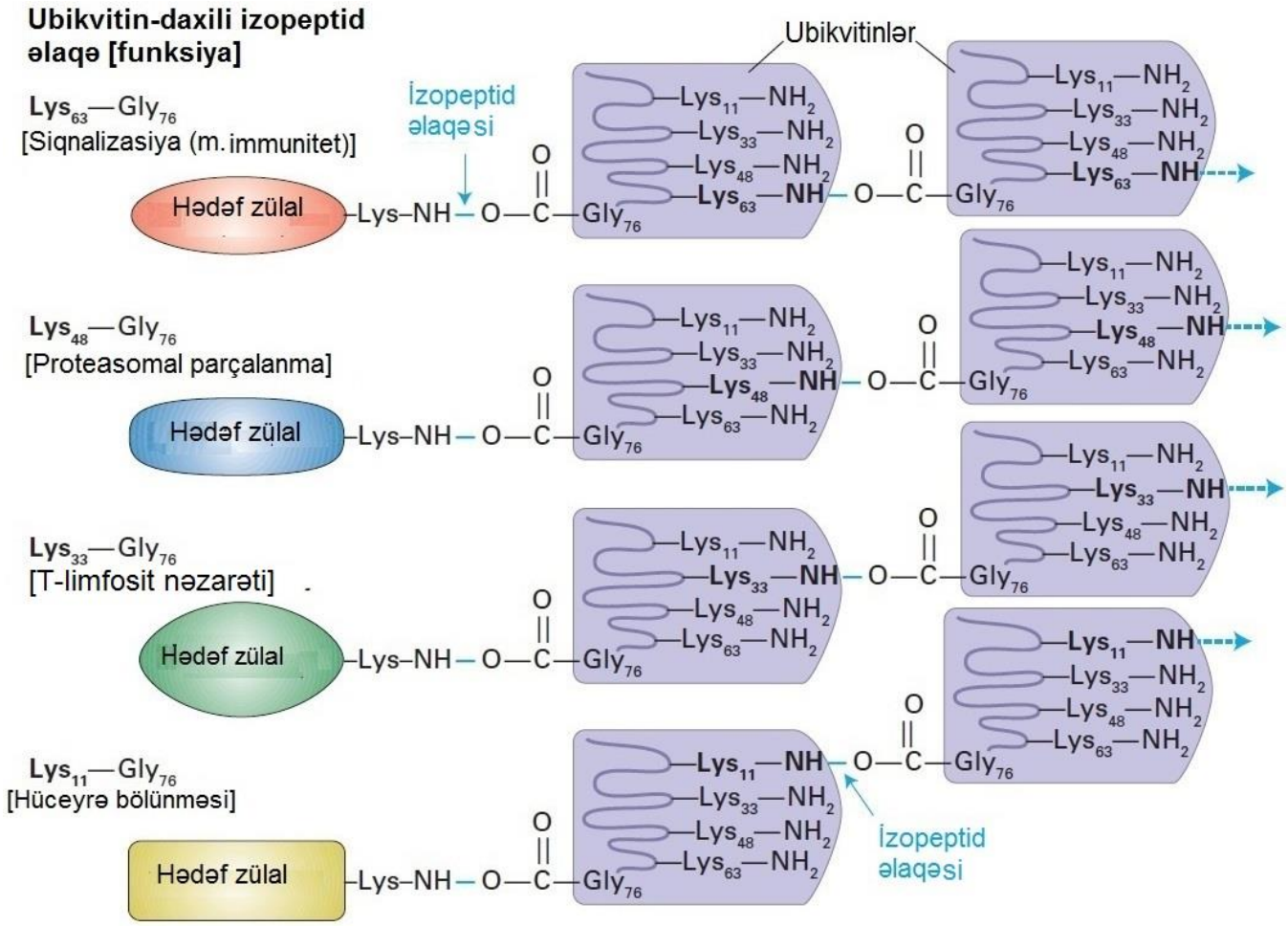
Mayada olan bütün zülalların 3 faizə qədəri proteinkinazalar və ya fosfatazalardır, bu da fosforlaşma və defosforlaşma reaksiyalarının hətta ən sadə hüceyrədə belə, əhəmiyyətə malik olduğunu göstərir. İnsan genomunun analizləri göstərir ki, təxminən 500 yaxın insan proteinkinazaları (insan "kinomu") mövcuddur. Zülalların bütün siniflərinin - o cümlədən quruluş zülalları, skafold zülallar, fermentlər, membran kanalları, və siqnal molekullarının - kinazalar/fosfatazalarla modifikasiya olunmaqla tənzimlənən nümayəndələri vardır. Müxtəılif proteikinazalar və fosfatazalar müxtəlif hədəf zülallar üçün spesifikdirlər və çox zaman fosforlaşan qalıqların yerləşdiyi fərqli xətti ardıcıllıqları tanıyırlar, ona görə də, sonrakı fəsillərdə müzakirə olunduğu kimi, müxtəlif hüceyrə yollarını tənzimləyirlər. Bəzi kinazalar çoxsaylı müxtəlif hədəfə malikdirlər, ona görə də, tək bir kinaza eyni zamanda müxtəlif hədəflərin fəallıqlarına inteqrasiya edərək fəaliyyət göstərirlər. Tez-tez hallarda bir kinazanın (və fosfatazanın) hədəfi başqa bir kinaza və ya fosfataza olduğundan onlar kaskad effekti yaradırlar. Siqnalların amplifikasiya olunmasını və incə-nizamlanma nəzarətini həyata keçirən belə kaskad kinazalara aid çox misallar vardır (bax Fəsil 15 və 6).

Ubikvitinləşmə və Deubikvitinləşmə Zülalların Fəallığını Kovalent Tənzimləyir

Həm ubikvitin həm də ubikvitinə-bənzər zülallar (insanlarda onlarla nümayəndəsi vardır) fosforlaşmaya anoloji olaraq, tənzimlənən formada hədəf zülallarla kovalent əlaqə yarada bilirlər. Deubikvitinaza, fosfatazaların fəaliyyətinə analoji olaraq ubikvitinləşməni geriyə qaytarır. Bu ubikvitin modifikasiyalar quruluşca fosforlaşma ilə müqayisədə daha mürəkkəbdir və beləliklə, ubikvitinləşmiş zülallar arasında və hüceyrənin başqa zülalları arasında bir çox müxtəlif qarşılıqlı əlaqələrin həyata keçirilməsində vasitəşilik edirlər. Ubikvitinləşmə sadəcə bir ubikvitin molekulunun zülala birləşməsi (**monoubikvitinləşmə**), vahid ubikvitin molekulunun hədəf zülalda çoxsaylı müxtəlif mərkəzlərə əlavə olunması (**multiubikvitinləşmə**) və ya ubikvitinlərdən ibarət olan polimer zəncirin zülala əlavə olunması (**poliubikvitinləşmə**) ola bilər. Variasiyanın başqa bir mənbəyi odur ki, ubikvitin molekulundakı müxtəlif amin qrupları, poliubikvitin zəncirini əmələ gətirmək üçün başqa bir ubikvitin molekulnun karboksil sonluğundakı Gly76 ilə izopeptidil əlaqəsinin yaranmasında istifadə oluna bilir. Ubikvitində olan bütün yeddi lizin qalığı (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 və Lys63) və ubikvitinin N-sonluğunun amin qrupu ubikvitinlərarası əlaqələrin yaranmasında iştirak edirlər. Müxtəlif ubikvitin liqazalar həm ubukvitinləşməli olan hədəf (substrat) zülala, həm də ubikvitinlər-arası izopeptid əlaqələrində iştirak edən ubikvitinin lizin yan zəncirinə (Lys63 və ya Lys48 və sair) spesifiklik göstərirlər (Şəkil 3-36). Ubikvitinləşmənin belə çoxsaylı formaları, onlarla müxtəlif ubikvitin birləşdirən domenə (UBD) malik olan yüzlərlə zülallarda (insanda >200) çoxsaylı zülal-zülal qarşılıqlı əlaqələrinin əmələ gəlməsində iştirak edən geniş müxtəliflikdə tanınma səthlərinin yaranmasına səbəb olurlar. Bundan başqa, istənilən verilmiş ubikvitin zənciri eyni anda birdən artıq UBD-si olan zülalı birləşdirmək potensialına malikdir, bu ubikvitinləşmədən-asılı olan multizülal kompleksinin əmələ gəlməsinə səbəb olur. Bəzi deubikvitenazalar modifikasiya

olunmuş zülallardan intakt poliubikvitin zıncirini ("lövbər edən" zəncir) kənarlaşdıra bilirlər və beləliklə başqa zülallara kovalent birləşməyən poliubikvitin zəncirini ("lövbər etməyən" zəncir) yaradırlar. Hətta bu "lövbər etməyən" zəncir tənzimləyici rol oynaya bilir. Təccübli deyil ki, belə böyük quruluş müxtəlifliyinə gərə hüceyrələr müxtəluf funksiyaların yerinə yetirilməsinə nəzarət etmək üçün ubikvitinləşmədən və deubikvitinləşmədən istifadə edirlər.

Biz artıq gördük ki, Lys48 qalığı ilə poliubikvitinləşmə zülalların proteasomlarda parçalanmaq üçün nişanlanmasında necə istifadə olunur. Sübut olunmuşdur ki, başqa lizin qalıqları ilə (məsəlın, Lys-11, və Lys-33, amma Lys-63 deyil) ubikvitinləşmədə zülalları proteosomlarda parçalanmaya hgədəf edir. Zülal parçalanmasına aid olmayan ubikvitinləşmə həmçinin müxtəlif hüceyrə funksiyalarına, o cümlədən molekulların endositoz yolu ilə hüceyrə daxilinə mənimsənilməsi (bax Fəsil 14), zədələnmiş DNTnin bərpası (reparasiya), metabolizm, məlumat RNT-nin sintezi (transkripsiya), patogenlərə qarşı müdafiə, hüceyrə bölünməsi/hüceyrə tsiklinin proqresi (gedişi), hüceyrənin siqnal yolları, hüceyrə daxilində zülalların daşınması (trafficking) və hüceyrələrin proqramlı şəkildə ölümü (apoptoz) kimi funksiyalara nəzarət edir. Ubikvitinlər-arası izopeptid əlaqələrin yaranmasında istifadə olunan lizin qalığı tənzimlənən hüceyrə sisteminin müxtəlifliyindən asılı olaraq dəyişilir (bax Şəkil 3-36). Məsələn, Lys-63 əlaqələri ilə baş verən poliubikvitinləşmə hüceyrənin müxtəlif identifikasiya və siqnal sistemlərində, hüceyrədaxili virus RNT-sinin tanınmasında və buna uyğun olaraq müdafiə immun cavab reaksiyalarının hazırlanmasında istifadə olunur. Lys-11-əlaqəli poliubikvitin zəncir hüceyrə bölünməsini tənzimləyir. Lys-33-əlaqəli zəncir T-limfositlər adlandırılan ixtisaslaşmış ağ qan hüceyrələrində reseptorların fəallığının dayandırılmasına (bax Fəsil 23), və bu reseptorları əmələ gətirən limfositlərin funksiyasına və fəallığına nəzarət edir.



ŞƏKİL 3-36 Poliubikvitin funksiyasının, ubikvitin-arasl izopeptid əlaqələrində istifadə olunan lizinlə təyini. Fərqli ubikvitin liqazalar, yaxındakı ubikvitinin Gly76 qalığı ilə ubikvitin-arası isopeptid əlaqələri (mavi) yaratmaq üçün ubikvitin molekulundakı müxtəlif lizin yan zəncirlərini (çəhrayı) istifadə edərək müxtəlif hədəf (substrat) zülallarda (rənglənmiş oval) poliubikvitinləşməni kataliz edirlər. Nöqtələnmiş mavi oxlar, görünməyən zəncirdəki əlavə ubikvitinləri göstərir. İzopeptid əlaqələr üçün istifadə olunan lizin poliubikvitinləşmənin funksiyasını müəyyən edir. Məsələn, Lys48:Gly76 izopeptid əlaqəli poliubikvitinlər parçalanmaq üçün hədəf zülalı proteasoma istiqamətləndirir. Lys63, Lys33 və Lys11 olan poliubikvitinlər uyğun olaraq siqnal sisteminə, T-limfositin nəzarət olunmasına və hüceyrə bölünməsinə təsir edirlər. Ubikvitin Lys6, Lys27 və Lys29 daxil olduğu izopeptid əlaqələr və N-sonluqlu amin qruplarının daxil olduğu əlaqələr (göstərilməyib) poliubikvitin zəncirin yaranmasında istifadə olana bilirlər.

Proteolitik Kəsilmələr Bəzi Zülalları Geriyə Dönməyən Şəkildə Fəallaşdırır və ya Dayandırır

Zülalların funksiyalarının fosforlaşma və ubikvitinləşmə yolu ilə geriyə dönən şəkildə fəallaşdırılması və ya dayandırılmasından fərqli olaraq proteolitik kəsilmə yolu ilə zülalların fəallığının tənzimlənməsi geriyə dönməyən mexanizmlədir. Məsələn, insulin kimi çox polipeptid hormonlar uzun səlәf polipeptid kimi sintez olunur və hüceyrədən ifraz olunmazdan öncə onların bəzi polipeptid əlaqələri hidroliz olunmalıdır ki, düzgün bükülmə getsin. Bəzi hallarda uzun vahid səlәf *prohormon* polipeptid kəsilərək bir neçə müxtəlif fəal hormonu əmələ gətirir. Mədəaltı serin proteazaların kiçik bağırsağa çatmazdan öncə zülalların qeyri müvafiq kəsmələrinə mane olmaq üçün onlar ***zimogenlər*** - qeyri fəal səlәf fermentlər kimi sintez olunurlar. Kiçik bağırsaqda tripsinogenin (tripsin zimogeni) N-sonluğuna yaxın peptid əlaqəsinin yüksək spesifikliyə malik olan proteaza ilə kəsilməsi yeni N-sonluqlu qalığı (Ile16) əmələ gətirir, və onun amin qrupu daxildəki asparagin turşusunun turş karboksil yan zənciri ilə ion əlaqələrini yaradır. Fermentdə bu konformasiya dəyişikliyini əmələ gətirməklə substrat-birləşdirən mərkəzi açaraq fermentin fəallaşdırılmasına səbəb olur. Fəal tripsin sonra tripsinogeni, kemotripsinogeni və başqa zimogenləri fəallaşdıra bilir.Buna bənzər, ammma daha dəqiq prorteaza kaskadları (bir proteaza başqasının qeyri fəal səlәfini fəallaşdırır) ilkin siqnalı amplifikasiya edərək qan laxtalanması kaskadı və komplement sistemi kimi bir sıra hüceyrə sistemlərində əhəmiyyətli rol oynayırlar (bax Fəsil 23). Belə sistemlərin dəqiqliklə tənzimlənməsinin əhəmiyyəti aydındır – lazımsız qan laxtalanması qan dövranı sistemini ölümcül tıxaya bilər, eləcə də laxtalanmanın kifayət qədər olmaması nəzarət oluna (dayandırıla) bilməyən qanaxmalara səbəb ola bilər.

Proteolitik prosessinqin nadir və qeyri adı tipi bakteriyalarda və bəzi eukariotlarda baş verən ***zülalların öz-özünü splaysinqi***dir. Bu proses filmin redaktə və ya montaj olunmasına bənzəyir: polipeptidin daxili seqmenti atılır və qalmış uclar yenidən birləşdirilir (liqasiya olunur). Proteolitik prosessinqin başqa formalarından fərqli olaraq zülalların öz-özünü splaysinqi avtokatalitik prosesdir və başqa heç bir fermentin iştirakı olmadan öz-özünə gedir (zülalın özü tərəfindən aparılır). Kəsilmiş peptid zülaldan, bəzi RNT molekullarının prosessinqində istifadə olunan mexanizm kimi, öz-özünü yox edir (bax Fəsil 10). Onurğalıların hüceyrələrində, bəzi zülalların prosessinqi öz-özünü-kəsmə ilə gedir, amma uyğun birləşmə - liqasiya mərhələsi olmur. Belə zülallardan biri, bir sıra inkişaf proseslərində kritik əhəmiyyətə malik olan, membrana-birləşmiş siqnal molekulu transmembrana Hechog (Hedgehog) zülalıdır (bax Fəsil 16).

Zülalların Yerləşməsinə Nəzarət Olunması Yüksək-Dərəcədə Tənzimlənməyə Aiddir

Bu vaxta qədər təsvir olunan bütün tənzimləyici mexanizmlər zülala onun fəaliyyət göstərdiyi yerdə, fəallığını işə salmaq və ya dayandırmaqla lokal təsir edir. Amma hüceyrənin normal fəaliyyət göstərməsi, həmçinin zülalların xüsusi kompartmentlərə ayrılmasını (seqreqasiyasını), məsələn mitoxondriyə, lizosomlara, nüvəyə görə ayrılmasını tələb edir. Fermentlərə gəldikdə, kompartment təkcə substratın çatdırılmasına və ya məhsulun çıxmasına nəzarət etmək imkanlarını təmin etmir, eyni zamanda reaksiyaların hüceyrənin ayrı-ayrı hissələrində baş verməsi üçün onların rəqabətinə imkan yaradır. Biz, hüceyrənin müxtəlif zülalları müxtəlif kompartmentlərə yönəltmək üçün istifadə etdiyi mexanizmləri Fəsil 13 və 14-də təsvir edirik.

3.4 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSIYALARI

Zülalların Fəaliyyətinin Tənzimlənməsi

- Zülallar kovalent və qeyri kovalent qarşılıqlı təsirlər vasitəsi ilə zülal sintezi, zülal parçalanması səviyyələrində və ya zülalların nizamlanan daxili fəallıqları səviyyəsində tənzimlənə bilirlər.
- Hüceyrədaxili zülalların həyat dövrü əsasən onların proteolitik parçalanmaya həssaslıq (uğramaq) qabliyyəti ilə müəyyən olunur.
- Çox zülallar parçalanmaq üçün ubikvitin liqaza vasitəsiilə poli-ubikvitin yarlıkla nişanlanır və sonra, daxilində çoxsaylı proteaza fəallığı olan mərkəzə malik, böyük silindirik komplekslərin, proteasomların daxili kamerasında parçalanırlar (bax Şəkil 3-31).
- Zülalların ubikvitinləşməsi, deubikvitinləşdirici fermentlərin fəallığı hesabına geriyə dönəndir.
- Allosteriyada, bir liqand molekulunun qeyri kovalent birləşməsi, allosterik effektor, zülalın fəallığını və ya onun başqa liqandlara affinliyini dəyişən konformasiya dəyişikliyini induksiya edir. Allosterik effektorlar quruluşuna görə, birləşərkən təsir etdikləri başqa liqandlarla eyni və ya fərqli ola bilirlər. Allosterik effektorlar aktivator və ya ingibitor ola bilərlər.
- Çoxsaylı eyni liqand molekulunu (burada oksigeni) birləşdirən hemoqlobin kimi multimer zülallarda bir liqand molekulunun birləşməsi sonrakı liqand molekullarının birləşmə affinliyini artıra və ya azalda bilər. Bu tip allosteriya kooperativlik kimi məlumdur (bax Şəkil 3-32).
- Bir sıra allosterik mexanizmlər, zülalın fəallığını geriyə dönən formada işə salmaq və dayandırmaqla keçirici rolunu oynayırlar.
- Hüceyrədaxili keçirici zülalları iki sinifi müxtəlif hüceyrə proseslərini tənzimləyirlər: (1) Ca^{2+}-birləşdirən zülallar (məsələn, kalmodulin) və (2) GTP-azalar superailəsinin nümayəndələri (məsələn Ras) GTP-birləşmiş fəal və GDP-birləşmiş qeyri fəal formalar arasında dövrə edirlər (bax Şəkil 3-34). GTP-azalar GTP-azanı fəal və qeyri fəal vəziyyətlər arasında dövrə etdirən zülalların (GAP, GEF, GDI) daxil olduğu komleks tənzimləyici şəbəkədə iştirak edirlər.
- Serin, treonin, və ya tirozin qalıqlarının yan zəncirində hidroksil qruplarının proteinkinazalarla və fosfatazalarla fosforlaşması və ya defosforlaşması bir sıra zülallarda geriyə dönən şəkildə **işə salma/dayandırma** tənzimlənməsini həyata keçirirlər (bax Şəkil 3-35).
- Ubikvitinlərin zülallara kovalent qoşulmasının təbiətinin variasiyaları (ubikvitin monomerlər arasında müxtəlif əlaqələri daxil edərək mono-, multi-, və poliu-bikvitinləşmə) proteasomla aparılan parçalanmadan savayı, zülalların

yerləşməsi və ya fəallıqlarında dəyişilmələr kimi geniş müxtəliflikdə hüceyrə funksiyalarında iştirak edirlər (bax Şəkil 3-36).

- Kovalent və qeyri kovalent tənzimlənmənin çoxsaylı müxtəlif tipləri geriyə dönəndir, amma tənzimlənmənin bəzi formaları, məsələn proteolitik kəsilmələr geriyə dönən deyildir.
- Yüksək dərəcədə tənzimlənməyə zülalların hüceyrədaxili lokalizasiyası və ya kompartmentalizasiyası daxildirlər.

3.5 Zülalların Aşkar Olunması, Təmizlənməsi və Xarakterizə Olunması

Çox hallarda zülalların quruluşu və onların təsir mexanizminin detalları öyrənilməzdən əvvəl onların təmizlənməsi lazım gəlir. Amma, zülallar ölçülərinə, formalarına, oliqamerləşmə dərəcəsinə, yükünə, və suda həll olma dərəcəsinə görə fərqləndiklərindən bütün zülalları ayırmaq üçün vahid bir metoddan istifadə etmək mümkün olmur. Hər hansı bir hüceyrədə olan tək bir zülalı ehtimal olunan 10000 müxtəlif zülallardan ayırmaq mürəkkəb məsələ olub, həm zülalların ayrılması metodlarını həm də onun mövcud olmasının aşkar edilməsi metodlarını tələb edir.

İstənilən molekul, onun zülal, karbohidrat və ya nuklein turşusu olmasından asılı olmayaraq başqa molekullardan onların fiziki, kimyəfi xüsusiyyətində olan bir və ya bir neçə fərqlərə görə ayrıla bilər. İki zülal arasında nə qədər böyük və çox sayda fərqlər olarsa onların ayrılması o qədər də asan və effektli olacaq. Praktiki cəhətdən xüsusi bir zülal bioloji nümunədə nə qədər zəngin olarsa onu nümunədəki başqa molekullardan ayırmaq da bir o qədər asan olacaqdır. Zülalları ayırmaq üçün daha çox istifadə olunan üç əsas xüsusiyyət: onların ***ölçüləri***, ya uzunluqları ilə ya da kütləsi ilə müəyyən olunur; xalis ***elektrik yükü***; və spesifik liqanda ***birləşmə uyğunluğu – afinliyidir***. Biz bu bölmədə, zülalların ayrılmaslı üçün bir neçə əhəmiyyətli metodu qısa şəkildə təsvir edirik; bu ayırma metodları nuklein turşularının və başqa biomolekulların ayrılması üçün də əhəmiyyətlidir. (Membran zülallarının membrandan ayrılması üçün istifadə olunan xüsusi metodlar, Fəsil 7-də bü zülalların unikal xüsusiyyətləri müzakirə olunduqdan sonra təsvir olunur.) Sonra biz, bioloji fəallıqları izləmək üçün radioaktiv komponentlərdən istifadə olunmanın əhəmiyyətinə baxırıq. Nəhayət sonda, biz zülalların kütləsini, ardıcıllığını və üç-ölçülü quruluşunu öyrənmək üçün bir sıra metodları təsvir edirik.

Sentrifuqada Fırlatma Kütləsinə və Sıxlığına Görə Fərqlənən Zərrəcikləri və Molekulları Ayıra Bilir

Tipik zülal təmizləm sxeminin birinci mərhələsi sentrifuqada fırlatmaqdır. Sentrifuqada fırlatmağın əsas prinsipi ondan ibarətdir ki, suspenziyada olan, kütləsinə və sıxlığına görə fərqlənən iki tip zərrəcik (hüceyrə, hüceyrə fraqmentləri, orqanoidlər və ya molekullar) sentrifuqa tyubunun dibinə müxtəlif sürətlə çökəcək. Yada salaq ki, kütlə nümunənin çəkisidir (dalton və ya molekul çəki vahidi ilə ölçülür), amma sıxlıq maddənin kütləsinin həciminə olan nisbəti ilə müəyyən olunur (çox hallarda qram/litr ilə ifadə olunur, çünki bu metod sıxlığı ölçmək üçün istifadə olunur). Zülallar kütləsinə görə güclü surətdə fərqlənirlər, amma sıxlıqlarına görə yox. Zülallar onlara birləşmiş lipidlər və ya karbohidratlar olmadan sıxlıqlarına görə 1.37 q/cm^3 orta zülal sıxlığından 15 faizdən artıq fərqlənmirlər. Ağır və daha sıx molekullar yüngül və az sıxlıqlı molekullara nisbətən daha tez çökür və ya *sedmentasiya* edir.

Sentrifuqa zərrəcikləri sentrifuqanın fırlanma gücünə, qravitasiya gücündən (g) 1 million dəfəyə qədər artıq olan gücə məruz qoyaraq sedmentasiyanı sürətləndirir, 10 kDa çəkiyə qədər olan kiçik molekulları çökdürürlər. Müasir sentrifuqalar yüksək sürətə məsələn 150000 döir dəqiqə (rpm) və ya daha artıq sürəti almaqla bu gücü əldə edirlər. Amma, molekul çəkisi 5kDa qədər olan kiçik zərrəciklər hətta belə yüksək sürətlə fırlatmada normal sedmentasiya etməyəcək (çökməyəcək). Müasir sentrifuqaların qeyri adi texniki nailiyyətləri həmçinin onunla qiymətləndirilə bilər ki, onlar bir neçə pound ağırlıqda olan rotorları (Amerika futbolu topu ölçüsündə), içərisində nümunələr olan tyublarla birlikdə bir saniyədə 2500 dövirə qədər fırladır.

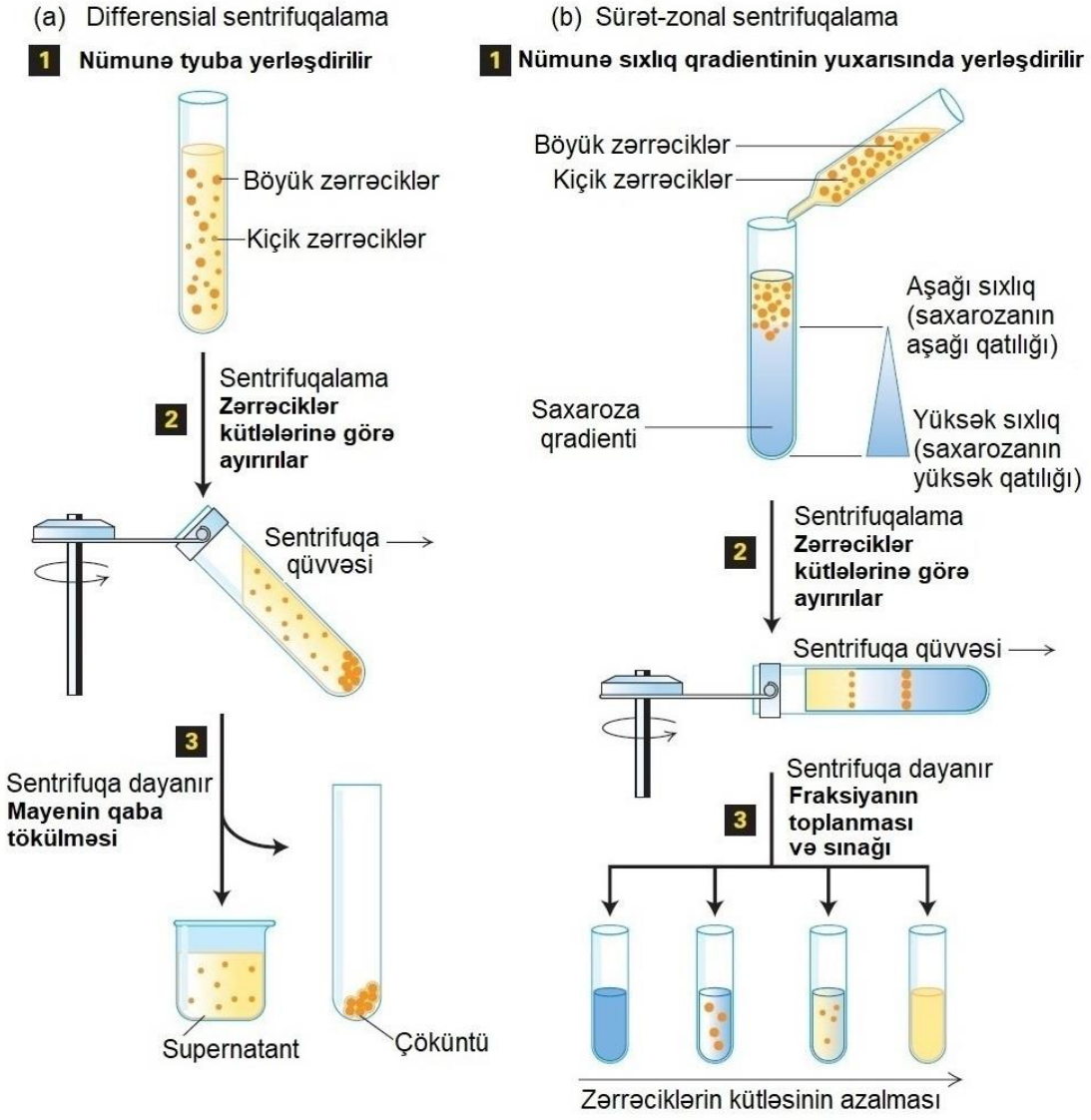
Sentrifuqalama iki əsas məqsədlə istifadə olunur (1) bir tip materialı başqalarından ayırmaq üçün preparativ metod kimi istifadə olunur, və (2) makromolekulların fiziki xüsusiyyətlərini (molekulyar çəki, sıxlıq, forma və birləşmə konstantı tarazlığı) ölçmək üçün analitik metod kimi istifadə olunur. Zülalın sedmentasiya konstantı, *s*, onun sedmentasiya dərəcəsinin ölçüsüdür. Sedimentasiya konstantı ümumi olaraq Svedberqlə (*S*) ifadə olunur, burada tipik böyük zülal kompleksləri təxminən 3-5S, proteasom 26S, eukariotik ribosom 80S-dir.

Differensial sentrifuqalama Hüceyrələrdən və ya toxumalardan zülalların təmizlənməsinin ən çox istifadə olunan ilkin mərhələsi suda-həll olan zülalların həll olmayan hüceyrə materialından ***differensial sentrifuqalama*** yolu ilə ayrılmasıdır. Başlanğıc qatışıq, ümumi halda hüceyrə homogenatı (mexaniki yolla dağıdılmış hüceyrələr) sentrifuqa tyublarına tökülür və rotorun sürəti ilə müəyyən zaman müddətində fırladılır, bu zaman müddətində fırlatma gücü hüceyrə orqanoidlərinin, məsələn nüvə, dağılmamış böyük hüceyrələr, və ya böyük hüceyrə fraqmentləri çöküntü kimi tyubun dibinə toplanır, suda-həll olan zülallar supernatantda (tyubda maye qatında) qalır (Şəkil 3-37a). Sonra, supernatant ya atılır, ya da o (supernatant) və ya orada olan çöküntü (pellet) onlarda olan müxtəlif zülalları ayırıb təmizləmək üçün başqa təmizləmə metodlarına məruz qoyula bilir.

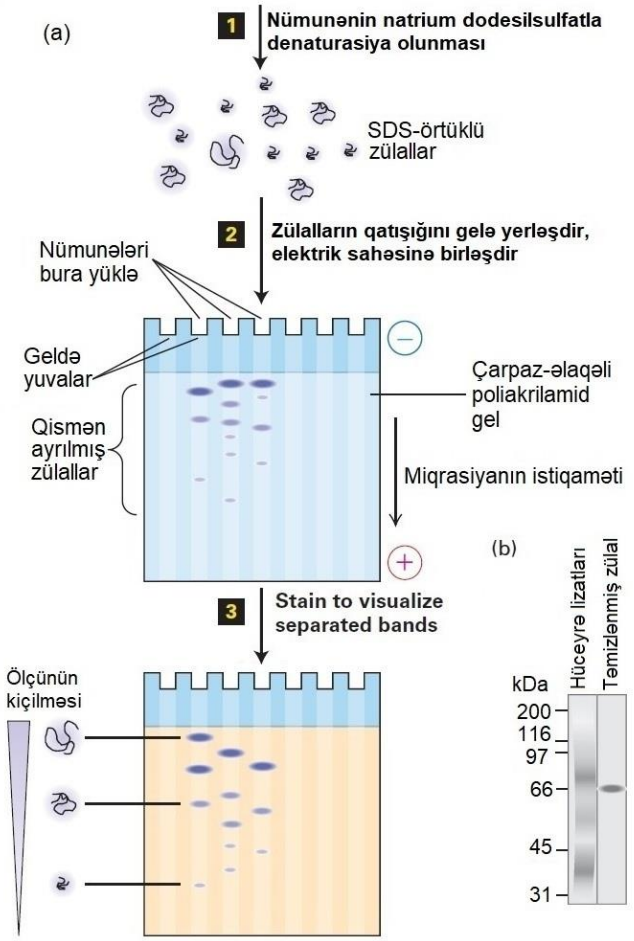
Sürətli-Zonal Sentrifuqalama Molekulyar kütlələrində olan fərqlərə əsasən, suda-həll olan zülallar sentrifuqalama yolu ilə ***sıxlıq qrqdienti*** adlanan, məhlulda sıxlığın artırılması yolu ilə ayrıla bilər. Sıxlıq qradientini yaratmaq üçün adətən qatı saxaroza məhlulundan istifadə olunur. Zülal qatışığı sentrifuqa tyubunda saxaroza sıxlıq qradientinin yuxarısına yerləşdirilir və sentrifuqalamaya məruz qoyulur, qatışıqda olan hər bir zülal sedmentasiya konstantının təsir etdiyi faktorlarla nəzarət olunan sürətlə tyub boyu aşağıya doğru miqrasiya edir. Bütün zülallar tyubun yuxarısında nazik zonadan başlayaraq zülalların kütlələrinə görə fərqlənən ayrı-ayrı bəndlərə (adətən disklər şəkilində) ayrılırlar. ***Sürətli-zonal-sentrifuqalama*** adlandırılan bu ayrılma metodunda nümunələr uzun zaman müddətində fırladılır ki, maraq daxilində olan zülül(lar) diskret bəndlərə ayrıla bilsinlər (Şəkil 3-37b). Əgər nümunə sentrifuqada çox qısa müddətə fırladılmışsa müxtəlif zülal molekulları kifayət

qədər ayrılmayacaqlar. Əgər nümunələr lazım olandan çox-çox artıq müddətə fırladılmışsa, onda bütün zülallar axıra kimi miqrasiya edib tyubun dibində çöküntüyə gedəcək.

Baxmayaraq ki, sedimentasiya sürətinə zərrəciklərin kütləsi güclü şəkildə təsir edir, sürətli-zonal sentrufuqalama dəqiq molekulyar çəkinin təyin olunması üçün nadir hallarda səmərəli olur, çünki formada olan variasiyalar (fərqlər) da sedimentasiya sürətinə təsir edir. Formanın dəqiq təsirlərini təyin etmək, xüsusən də müxtəlif kompleks formaları ala bilən zülallar və başqa molekullar, məsələn, bir-zəncirli nuklein turşusu molekulları üçün çətindir. Buna baxmayaraq, sürətli-zonal sentrufuqalama, çoxsaylı müxtəlif tipli polimer və zərrəciklərin ayrılmaslnda istifadə olunan praktiki metod kimi tanınmışdır. ***Sıxlıq-qradient tarazlığı sentrifuqalama*** adlanan ikinci sıxlıq-qradienti metodu əsasən DNT molekullarının, dövrə-edici sistemlərdə lipidləri daşıyan lipozülalların və ya orqanoidlərin ayrılmasılnda istifadə olunur (bax Şəkil 3-37).



EXPERIMENTAL ŞƏKIL 3-37 Sentrifuqalama metodu kütləsinə və sıxlığına görə fərqlənən zərrəcikləri ayırır. (a) Differensial sentrifuqalamada hüceyrə homogenatı və ya qatışıqlar kifayət qədər uzun müddət fırladılır ki, böyük hissəciklər (hüceyrə orqanoidləri, hüceyrələr) sedmentasiya etsinlər və tyubun dibinə çöküntü kimi toplansınlar (pillə 2). Daha kiçik zərrəciklər (həll olan zülallar, nuklein turçuları) başqa tyuba keçirilə bilən maye supernatantda qalırlar (pillə 3). (b) Sürətli-zonal sentrifuqalamada qatışıq kifayət qədər zaman müddətinə fırladılır (pillə 1) ki, ümumi istifadə olunan, qatı sxaroza məhlulu ilə yaradılan sıxlıq qradienti-sentrifuqalamasında formasına və sıxlığına görə eyni olan, amma kütləsinə görə fərqlənən molekullar (məsələn, qlobulyar zülallar, RNT molekulları) diskret zonalara ayrılsınlar. Fraksiyalar tyubların dibindən çıxarılıb sınaq yoxlama üçün istifadə olunur.



EXPERIMENTAL ŞƏKIL 3-38 SDS-poliakrilamid gel elektroforezi (SDS-PAQE) zülaları əsasən onların kütləsinə görə ayırır. (a) Mənfi yüklənmiş detergent SDS ilə ilkin təsir etmə multimer zülalları dissosasiya edir və bütün polipeptid zəncirləri denaturasiya edir (pillə 1). Elektroforezin gedişi zamanı SDS-zülal kompleksləri poliakrilamid geli boyu miqrasiya edir (illə 2). Kiçik komplekslər böyük komplekslərlə müqayisədə poliakrilamid gelin məsamələrindən daha sürətlə hərəkət edib keçirlər. Beləliklə zülallar öz ölçülərinə uyğun olaraq miqrasiya etdikləri kimi bəndlərə ayrılırlar. Ayrılmış zülal bəndləri rəngləyici reagentlərlə rəngləməklə vizuallaşdırılır (pillə 3). (b) Tam hüceyrə lizatlarında (detergentlə həll olunan zülal) bütün zülalların SDS-PAG elektroforezində ayrılması nümunəsi: (*solda*) çox sayda ayrılıb *rənglənmiş* zülallar bir-birinin davamı kimi görünürlər; (*sağda*) zülal anticism-affin xromotoqrafiya yolu ilə lizatdan bir pillədə təmizlənmişdir. Zülal gümüş-əsaslı rənglə boyamaqla vizuallaşdırılmışdır. [(b) hissəsi B.Liu and M.Krieger, 2002, J.Biol.Chem.277(37):34125-34135-dən.]

Elektroforez Molekulları Onların Yükün-Kütləyə Olan Nisbətinə Əsasən Ayırır.

Elektroforez molekulları qatışıqda tətbiq olunan elektrik sahəsinin təsirinə görə ayırır və zülalları və nuklein turşularını öyrənmək üçün ən çox istifadə olunan metodlardan biridir. Həll olmuş molekullar elektrik sahəsində öz yüklərinin-kütlələrinə olan (**yük:kütlə**) nisbəti ilə və onların hərəkət etdiyi mühitin fiziki xüsusiyyətləri ilə müəyyən olunan sürətlə hərəkət edir və ya miqrasiya edirlər. Məsələn, əgər iki molekul eyni kütləyə və formaya malikdirlərsə, xalis yükü daha yüksək olan müsbət polyarlığa malik olan elektroda tərəf daha sürətlə hərəkət edəcək.

SDS-Poliakrilamid Gel Elektroforezi Ölçülərinə və formalarına görə fərqlənən çoxl zülallar və nuklein turşuları demək olar ki, eyni (və ya həddən artıq yaxın) yük:kütlə nisbətinə malikdirlər, məhlul qatışığında belə makromolekulların elektroforezi müxtəlif uzunluqlara malik olan molekulların çox az ayrılması və ya tamamilə ayrılmaması ilə nəticələnir. Amma, zülalların və nuklein turşularının uğurlu ayrılması maye məhlula nisbətən müxtəlif gellərlə (donmuş jelatin kimi suda yarımbərk suspenziya) aparılan elektroforezlə daha uğurla həyata keçirilə bilər.

Zülalların qatışığı gelə yerləşdirilərkən və elektrik cərəyanı verilərkən kiçik molekullar böyük molekullara nisbətən geldə daha sürətlə miqrasiya edirlər, çünki gel ələk rolunu oynayır və bu "ələyin" deşikləri arasında kiçik molekullar böyük zülallara nisbətən daha sürətlə manevr edə bilirlər. Molekulun forması da onların miqrasiya sürətinə təsir edə bilir (uzun asimmetrik molekullar, eyni kütləyə malik olan sferik molekullarla nisbətdə daha zəif sürətlə miqrasiya edirlər).

Zülalların elektroforez yolu ilə ayrılması əsasən poliakrilamid gelində aparılır. Gellər adətən yastı hamar (müstəvi) şəkildə tökülür, kifayət qədər nazik iki şüşə lövhə arasında polimerləşdirici məhlulda tökülən akrilamid monomerləri poliakrilamid zəncirlərinə çevrilir və eyni zamanda zəncirlər köndələn-kəsişən əlaqələrlə (cross-linking) birləşərək yarımbərk matrisaya çevrilir. Geldə məsamələrin ölçüsü poliakrilamidin qatılığını və köndələn-kəsişən reagentlərin qatılığını dəyişməklə tənzimlənə bilir. Zülallarlın geldə hərəkət sürətinə gelin məsamələrinin ölçüsü və elektrik sahəsi təsir edir. Bu parametrlərin əlverişli tənzimlənməsi ilə böyük ölçü fərqlərinə malik olan geniş sırada zülalar qatışığı poliakrilamid gel elektroforezi (PAGE) vasitəsi ilə bir-birindən ayrıla bilər.

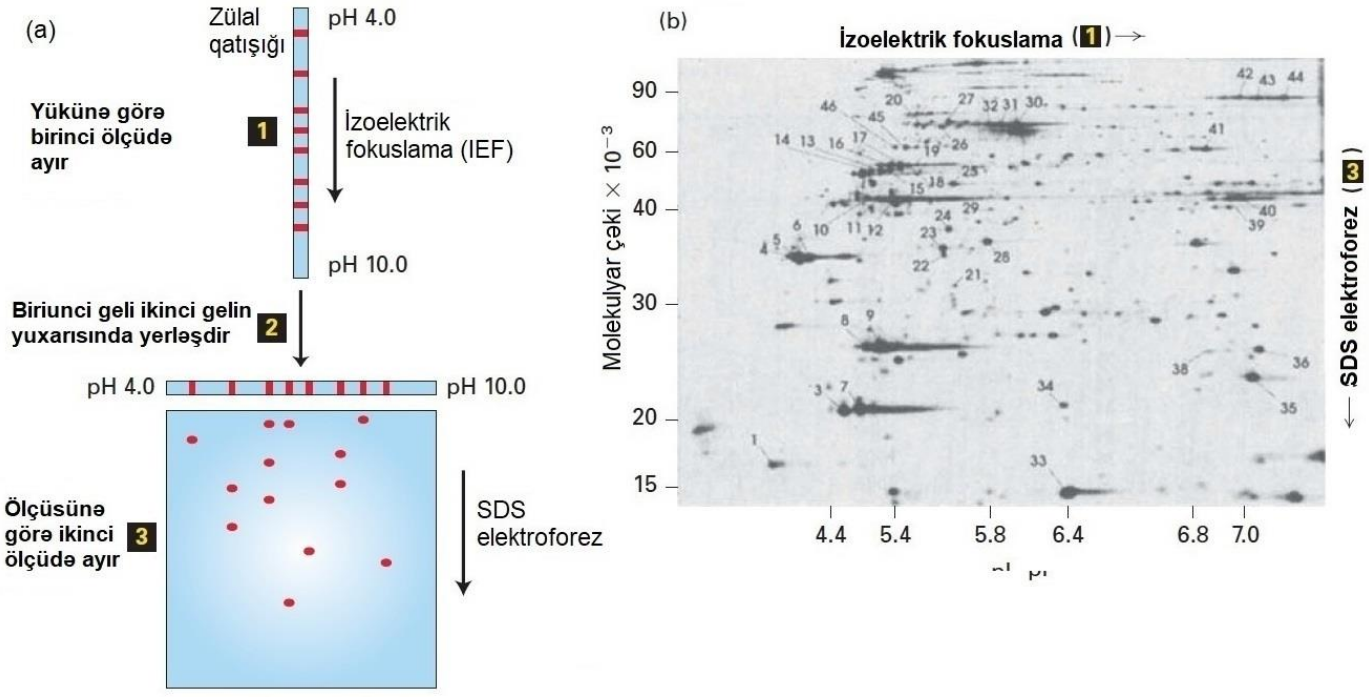
Zülal qatışıqlarının ayrılmasında istifadə olunan ən güclü metodda zülallar elektroforez prosesində istifadə olunana qədər və elektroforez prosesi zamanı ionlaşan detergen SDS-in (sodium dodesilsulfat) təsirinə məruz qoyulur (Şəkil 3-38). SDS zülalları denaturasiya edir, qismən ona görə ki, o hidrifob yan zıncirlərə birləşir, və zülalın özəyində stabil konformasiyanı təmin edən hidrofob qarşılıqlı təsiri destabilləşdirir. SDS ilə təsir etmə adətən zülalı qızdırmaqla və çox hallarda disulfid əlaqələrini qıran reduksiya edici agentlərlə birlikdə aparılır. Bu şəraitdə multimer zülalların əksəriyyəti subvahidlərə dissosasiya edir. Adətən zülala birləşən SDS-in miqdarı onun a.t. ardıcıllığından asılı olmadan polipeptid zəncirin uzunluğuna proporsional olur. İki eyni ölçüdə olan ayrı-ayrı zülallar tamamilə eyni miqdarda SDS-lə birləşəcək, halbuki iki dəfə böyük ölçüyə malik olan zülal iki dəfə artıq SDS-lə birləşəcək. Kompleks zülal qatışığının SDS və qızdırmaqla birlikdə denaturasiyası adətən hər bir polipeptidin genişlənmiş konformasiya keçməsinə məcbur edir və qatışıqda hər bir zülala konstant kütlə:yük nisbətini (ratio) verir, çünki mənfi yüklənmiş dodesil sulfat əsas yük verəndir. SDS birləşmiş zülallar poliakrilamid geldə hərəkət edərkən, onlar ölçülərinə uyğun olaraq gelin "ələk" prinsipi əsasında ayrılırlar. Beləliklə, SDS ilə təsir etmək müxtəlif formanın nativ quruluşunda əmələ gətirdiyi fərqləri aradan çıxarır; ona görə də kütləyə uyğun olan zəncirin uzunluğu zülalların ***SDS-poliakrilamid gel elektroforezində*** (***SDS-PAGE***) miqrasiya sürətinin əsas təyinedicisidir. Hətta molekul çəkiləri bir-birindən 10 faiz fərqlənən zülallar bu yolla ayrıla bilirlər. Bundan başqa, zülalların molekul çəkiləri onların geldə miqrasiya etdikləri məsafənin molekul çəkiləri məlum

olan zülal molekullarının (molekul çəki "standartları" adlanır) həmin geldə miqrasiya etdikləri məsafə ilə müqayisə edilməklə hesablana bilər (təxminən demək olar ki, miqrasiya məsafəsi ilə molekul çəkinin loqarifmi arasında xətti əlaqələr vardır). Gel daxilindəki zülal daha sonrakı analizlər üçün ekstraksiya oluna bilər (məsələn aşağıda təsvir olunan metodla identifikasiya etməklə).

Əgər iki və ya daha artıq polipeptid disulfid əlaqələri ilə çarpaz kəsişirsə zülalın SDS-PAGE-də miqrasiya sürəti elektroforez başlayana gədər zülalın bu əlaqələri qırmaq üçün reduksiya olunub olunmamasından asılı olacaqdır. Çarpaz kəsişən zülallar fərdi reduksiya olunmuş subvahidlərdən daha böyük görünəcəkdir. Reduksiya olunmuş və olunmamış nümunələri analiz etməklə belə zulalları və onların komponent polipeptidlərini identifikasiya etmək olar.

İki-ölçülü gel elekjtroforezi Hüceyrənin bütün zülallarının SDS-PAG elektroforezi zamanı kütləsində kifayət qədər böyük fərqə malik olan zülalları ayırmaq olur, amma təxminən eyni kütləyə və ya çox yaxın kütləyə malik olan zülalları (məsələn 41 kDa qarşı 42 kDa zülalı) ayırmaq olmur. Oxşar kütləyə malik olan zülalları ayırmaq üçün başqa fiziki xüsusiyyət istifadə olunmalıdır. Hər şeydən qabaq, zülallarda belə bir ümumi xüsusiyyət nümunənin pH-ından və zülalın müsbət və mənfi yüklənmiş qruplarının nisbi sayından asılı olaraq təyin olunan elektrik yükünün olmasıdır, bu isə öz növbəsində zülaldakı ionlaşmış qrupların pK_a-larından (bax Fəsil 2) asılıdır (adətən amin və karboksil sonluqlar və lizində və aspartat turşusundakı kimi yan zəncirlər). Oxşar molekulyar kütləyə malik olan iki yaxın olmayan zülal aminturşu ardıcıllığındakı fərqə görə çətin ki, eyni xalis yükə malik olsunlar, belə ki, onlarda turş və əsas qalıqların sayı müxtəlifdir.

İki-ölçülü elektroforezdə, zülallar ardıcıl olaraq ayrılırlar, birinci onlar yüklərinə görə, sonra da kütləlirinə görə (Şəkil 3-39a). Birinci mərhələdə, hüceyrə və ya toxuma ekstraktları yüksək qatılıqlı (8 M) sidik cövhərində (bəzən də SDS-də) denaturasiya olunurlar, və sonra tərkibində sidik cövhəri olan gelin nazik zolaqlarının yuxarısına yerləşdirilirlər, sidik çövhəri istənilən birləşmiş SDS-i ayırıb uzaqlaşdırır, və pH qradienti davam edir. pH qradient, polianion və polikation kiçik molekulların qatışığından ibarət olan amfolitlərlə gelin içərisində yaradılır və gellə birlikdə qəlbə tökülür. Gel elektrik sahəsinə qoşularkən (və ya verilərkən) amfolitlər elə miqrasiya edəcək ki, daha çox mənfi yüklənmiş amfolitlər anoda tərəf gedəcək, orada onlar turş pH yaradacaqlar (çoxlu miqdarda protonlar), amma müsbət yükü daha çox olan amfolitlər katoda tərəf miqrasiya edəcək, haradakı onlar qələvi pH yaradacaqlar. Amfolitlər qarışığının diqqətlə seçilməsi və gelin hazırlanması imkan verir ki, haradasa pH-3.0 dən pH-10 qədər daha stabil pH qradient yaradılsın. Belə bir gelin bir ucuna yerləşdirilmiş yüklü zülal, öz izoelektrik nöqtəsinə (pI), zülalın xalis yükü sıfır olan andakı pH nöqtəsinə, çatana kimi bütün qradienti miqrasiya edəcək. Xalis yükü olmayan zülal elektrik sahəsinin təsiri altında miqrasiya etməyəcək. ***İzoelektrik fokuslaması (IEF)*** adlanan bu metod, yalnız bir yük vahidində fərqlənən zülalları da ayıra bilir. Bu metod o qədər həssasdır ki, eyni zülalın fosforlaşmış və fosforlaşmamış formalarını ayırmağa imkan verir.



EKSPERIMENTAL ŞƏKIL 3-39 İki-ölçülü gel elektroforez zülalları yükünə və kütləsinə görə ayırır. (a) Bu metodda zülallar birincisi izoelektrik fokusunda olan yükə gorə bəndlərə ayrılırlar (pillə 1). Nəticədə, alınmış gel zolağı SDS akrilamid gelinə tətbiq olunur (pillə 2) və zülallar kütləsinə götə bəndlərə ayrılırlar (pillə 3). (b) Kultura olunan hüceyrələrdən alınmış zülal ekstraktının bu iki-ölçülü geldəki hər bir ləkəsi (bəndi) bir polipeptidi tərənnüm edir. Polipeptidlər, burada göstərildiyi kimi, rəngləməklə, və ya başqa bir metod, avtoradioqrafiya yolu ilə görünə bilir. Hər bir polipeptid izoelektrik nöqtəsinə görə (pI) və molekulyar çəkisinə görə xarakterizə olunur. [(b) hissəsi Michael J.Dunn tərəfindən verilmişdir.]

IEF gelində ayrılan zülallar sonra, ikinci-ölçü gelində molekul çəkilərinə görə ayrıla bilirlər. Bu ayrılmanı həyata keçirmək üçün IEF gel zolağının kəsiyi, uzununa (köndələn) şəkildə vərəqəbənzər (ikinci ölçü və ya lövhəşəkilli), poliakrilamid gelinin kənar (yuxarı) ucuna yerləşdirilir, hər bir ayrılan zülala konstant kütlə:yük nisbəti vermək üçün bu dəfə gel SDS ilə doydurulur. Elektrik sahəsi verilərkən, zülallar IEF gelindən SDS gel lövhəsinə miqrasiya edəcək və sonra kutlələrinə əsasən ayrılacaqlar. Zülalların yükünə və kütləsinə görə ardıcıl ayrılması yolu ilə hüceyrə zülallarının ayrılmasını əldə etmək olar (Şəkil 3-39b). Məsəlıən, iki-ölçülü gellər proteasomların differensasiya olunmamış və differensasiya olunmuş heceyrələrdə və ya normal və xərçəng hüceyrələrində müqayisəsi üçün çox əhəmiyyətli olmuşdur, çünki eyni zamanda 1000-dən çox zülal fərdi ləkələr şəklində ayrıla bilər. Təəssüf ki, bu metoddan istifadə etməklə membran zülalları kifayət qədər pis ayrılır. İki-ölçülü gellərdə, biri-birinə yaxın olan, amma fərqli nümunələrdə (normal toxumalara qarşı mutant fərdlərdən alınmış toxumalarda) zülalların kompleks profilini müqayisə etmək üçün, nümunələrdə zülalların tiplərindəki və ya miqdarındakı fərqlərin identifikasiyası (qeydiyyatı) üçün məharətli metodlar yaradılıb inkişaf etdirilmişdir (bax, aşağıda Bölmə 3.6 -da Proteomiks). Bu gün, iki-ölçülü gel elektroforezin əvəzinə aşağıda təsvir olunan, daha mürəkkəb və kamil metod olan Mass Spektrometriya kompleks nümunədə zülal komponentlərini təyin etmək üçün və eləcə də müxtəlif bioloji nümunələrdə bu komponentlərin miqdarındakı dəyişiklikləri müqayisə etmək üçün istifadə olunur.

Maye Xromotoqrafiya Zülalları Kütləsinə, Yükünə, və ya Affinliyinə Görə Ayırır

Zülalların və ya zülal fraqmentlərinin, eləcə də başqa molekulların qatışıqlardan ayrılmasında çox istifadə olunan üçüncü əsas metod molekulların həll olduğu məhlulda, molekulun və səthin fiziki və kimyəvi xüsusiyyətindən asılı olaraq onların bərk mühitlə fərqli qarşılıqlı təsirdə olmasına (birləşməsinə və ya dissosasiyasına) əsasılanmışdır. Əgər məhlulun səthdən axıb keçməsinə imkan verilirsə, səthlə daha tez qarşılıqlı təsirdə olan molekullar səthlə birləşmış şəkildə daha çox vaxt sərf edəcəklər və səthlə az qarşılıqlı əlaqədə olan molekullarla müqayisədə səthdən daha zəif sürətlə axıb keçəcəklər. **Maye xromotoqrafiya** (LC) adlanan bu metodda nümunələr şüşə, metal və ya plastik silindirlərdə sıx şəkildə qablaşdırılmış kürəvi qranulalardan ibarət olan kolonkanın yuxarısına yerləşdirilir (Şəkil 3-40). Sonra nümunə kolonkada, ya qravitasiya qüvvəsi, ya hidrostatik qüvvə hesabına, ya da kiçik nasosun köməyi hesabına aşağıya doğru hərəkət edir. Bəzi LC sistemlərində kolonkadan axıb çıxan mayenin tərkibi ardıcıl şəkildə (məsələn, spektroskopik yolla) yoxlanılır. Kolonkanı axıb keçən məhlulun ***fraksiyalar*** adlandırılan kiçik alikvotları ardıcıl olaraq toplanır və kimyəvi fəallıqlarına (məsələn fermentativ fəallıqlarına) görə analiz olunur. Kolonkada olan qranulaların təbiəti keçən zülalların ayrılmasının kütlə, yük və ya birləşmə xassələrindəki (məsələn, qranulalara birləşmiş maddələrə olan afinlik) fərqlərdən asılı olmasını müəyyən edir.

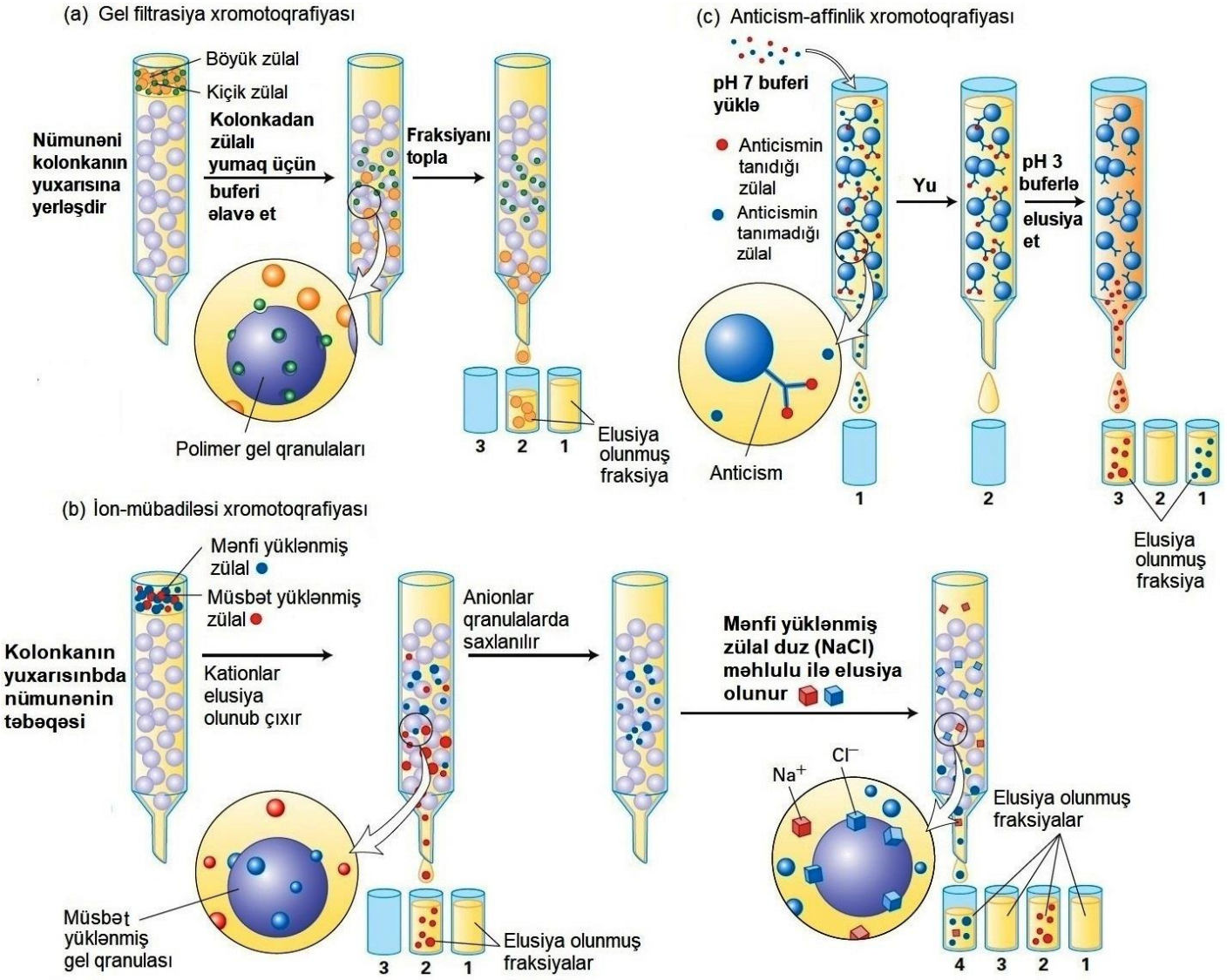
Gel Filtrasiya Xromotoqrafiyası Kütləsinə görə fərqlənən zülalları poliakrilamiddən, dekstrandan (bakterial polisaxarid), və ya aqarozadan (dəniz yosunu törəmələri) düzəldilmiş məsaməli qranulalardan təşkil olunmuş kolonkada ayırmaq olur və bu metod gel filtrasiya xromotoqrafiyası adlanır. Baxmayaraq ki, gel filtrasiya xromotoqrafiyasında zülallar sferik qranulalar arsından axıb keçir, amma onlar, qranulaların səthini örtən böyük batıqlardan (çuxurlardan) keçərkən müəyyən zaman sərf edirlər. Xırda molekullar böyük molekullara nisbətən bu batıqların içərisinə daha tez-tez girib çıxdığından (və ya ondan içərisindən keçdiyindən) onlar böyük molekullara nisbətən gel filtrasiya kolonkasında daha zəif hərəkət edirlər (Şəkil 3-40a). (Bunun əksinə, elektroforez gelində zülallar məsamələrindən miqrasiya edib keçir, ona görə də elektroforez zamanı kiçik molekullar böyük molekullara nisbətən daha tez hərəkət edirlər.) Gel filtrsiya kolonkasından zülalları ayırıb çıxarmaq üçün tələb olunan ümumi mayenin miqdarı onun kütləsindən asılıdır: molekul kütləsi nə qədər kiçik olarsa zülalın miqrasiyasına o qədər də çox zaman tələb olunacaq və uyğun olaraq elusiya üçün o qədər çox maye tələb olunacaq. Kütləsi məlum olan zülalların standart kimi istifadə olunaraq kolonkanın kalibrlənməsi elusiya məhlulunun həcmini istifadə etməklə qatışıqda olan zülalaın kütləsini hesablamaq olar. Zülalın forması da onun kütləsi kimi elyusiya həcminə təsir edə bilir.

İon-mübadiləsi xromotoqrafiyası İon-mübadiləsi xromotoqrafiyasında zülallar onların yüklərində olan fərqə görə ayrılırlar. Bu metod, xüsusi modifikasiya olunmuş qranulalardan istifadə etməklə həyata keçirilir, qranulaların səthi amin qrupları və ya karboksil qrupları ilə örtülür, ona görə də neytral pH şəraitində ya müsbət yükə (NH_3^+) ya da mənfi yükə (COO^-) malik olurlar.

Qatışıqdakı zülallar istənilən pH qiymətində fərqli xalis yükü daşıyırlar. Zülal qatışıqlarının məhlulu müsbət yüklənmiş qranulalarla doldurulmuş kolonkadan axıb keçərkən yalnız xalis mənfi yükə malik olan zülallar (turş zülallar) qranulalara birləşəcəklər, neytral və müsbət yüklənmiş (əsasi) zülallar heç bir çətinlik törətmədən kolonkadan axıb keçəcəklər (Şəkil 3-40b). Sonra, turş zülallar selektiv şəkildə duz məhlulunun getdikcə artan qatılığı ilə (duz qradienti) kolonkadan elusiya edilir. Aşağı duz qatılıqlarında, zülal molekulları və qranulalar əks yükləri ilə bir-birini cəlb edirlər. Yuxarı duz qatılıqlarında, mənfi yüklü duz ionları müsbət yüklənmiş qranulalara birləşərək mənfi yuklü zülalları əvəz edirlər. Artan duz qatılığının qradientində, nisbətən aşağı yüklü zəif birləşmiş zülallar birinci elusiya olunurlar, və daha böyük yükə malik olan zülallar axırıncı elusiya olunurlar. Buna oxşar olaraq, mənfi yüklənmiş kolonka müsbət yüklənmiş zülalları (əsasi zülalları) fraksiyalara ayirmaq üçün istifadə oluna bilər.

Affin Xromotoqrafiyası Zülalların xüsusi olaraq başqa molekullara birləşmək qabliyyəti affin xromotoqrafiyasının əsasını təşkil edir. Bu metodda, axtarılan zülala birləşən liqand və ya başqa molekullar kovalent şəkildə kolonkaya doldurulmuş qranulalara birləşirlər. Liqandlar fermentlərin substratları, ingibitorlar, və ya onların analoqları, və ya xüsusi zülallara birləşən digər kiçik molekullar ola bilər. Bu metodun geniş istifadə olunan forması ***anticism-affinliyi*** və ya ***immuno-affinlik xromotoqrafiyasında*** qranulalara birləşmiş molekul axtarılan zülala spesifik olan anticismdir (Şəkil 3-40c), (Zülalları öyrənmək üçün anticismlərdən bir metod kimi istifadə olunmasını biz aşağıda müzakirə edirik; həmçinin, anticismlərin necə istehsal edildiyinin müzakirə oldunduğu Fəsil 23-ə bax.)

Affin kolonkası prinsipcə, yalnız qranulalara qoşulmuş molekullara birləşən zülalları saxlayacaq, qalan zülallar, onların kütləsindən və yükündən asılı olmayaraq birləşmədiklərindən kolonkadan keçib gedəcəklər. Amma, əgər qalan zülal öz növbəsində, başqa molekullara birləşdiyindən kompleks əmələ gətirirsə, onda bu kompleks kolonkada qalır. Affin kolonkasına birləşmiş zülal sonra liqandın məhlul formasının yüksək miqdarda əlavə olunması ilə, birləşmiş materialları detergentlərə məruz qoymaqla, və yaxud kiolonkada birləşmiş materialın ondan ayrılmasına səbəb olan duz qatılığını və ya pH-ı kəskin dəyişməklə elusiya olunur. Bu metodun xüsusi zülalları ayırmaq imkanları, başqa molekullara nisbətən maraq daxilində olan molekula daha sıx birləşmə qabliyyətinə malik olan müvafuq birləşmə partnyorlarının seçilməsindəm asılıdır.



EKSPERIMENTAL ŞƏKIL 3-40 Çox istifadədə olunan üç maye xromotoqrafiya metodları zülalları kütləsinə görə, yükünə görə və birləşdiyi xüsusi partnyora affinliyinə örə ayırır. (a) Gel filtrasiya xromotoqrafiyası zülalları ölçülərindəki fərqlərə görə ayırır. Zülalların qatışığı, ehtiyatla silindirə qablaşdırılmış məsaməli qranulaların yuxarısına yerləşdirilir. Kiçik zülallar kolonkadan böyük zülallara nisbətən daha zəf sürətlə keçirlər. Beləliklə, kolonkanın aşağısından axaraq müxtəlif vaxtlarda eluatda çıxan müxtəılif zülallar ***fraksiyalar*** adlandırılan (müxtəlif elusiya həcmi) müxtəlif tyublarda toplana bilər. (b) İon-mübadiləsi xromotoqrafiyası zülalları, müsbət yükə (burada göstərilən) və ya mənfi yükə malik olan xüsusi qranula ilə doldurulmuş kolonkalarda, xalis yükünə görə ayırır. Qranulalarla eyni xalis yükə malik olan zülallar dəf olunurlar və zülallar kolonkanı axaraq keçirlər, amma qranulalardan fərqli yükə malik olan zülallar onların quruluşlarından asılı olaraq qranulalara daha sıx birləşirlər. Birləşmiş zülallar - bu halda, mənfi yüklənmiş zülallar duz qradienti ilə (adətən NaCl və ya KCl) kolonkadan elusiya olunurlar. İonlar qranulalara birləşdiyindən onlar zülalları əvəz edirlər, daha sıx birləşmiş zülallar qranulalardan ayrılmaq üçün daha yuxarı qatılıqlı duz məhlulunu tələb edirlər. (c) Anticism–affinliyi–xromotoqrafiyasında zülallar qatışığı, xüsusi anticismin kovalent tikildiyi qranulalarla doldurulmuş kolonkadan keçir. Yalnız anticismə yüksək uyğunluğu olan zülal kolonkada tutulub qalacaq, qalan bütün birləşməmiş zülallar kolonkadan axıb çıxacaq. Kolonka yuyulduqdan sonra birləşmiş zülallar turş məhlulla, və ya antigen-anticism kompleks əlaqələrini qıra bilən başqa məhlulla elusya olunur, azad olmuş zülal kolonkadan axıb çıxır və tyublara toplanır.

Yüksək Spesifikli Ferment və Anticismlə Sınaqlar Fərdi Zülalları Tapmağa Imkan Verir

Zülalın və ya istənilən başqa molekulun təmizlənməsi, başqa molekullardan ayrılan kimi (məsələn, kolonkada və ya sıxlıq qradienti fraksiyalarında və ya gel bəndlərində və ləkələrində), maraq daxilində olan molekulun mövcud olduğunu təyin edən xüsusi sınaq yoxlamasının aparılmasını tələb edir. Sınaq yoxlama, zülalın xüsusi liqandı birlışdirmək qabliyyəti, xüsusi reaksiyanı kataliz etmək qabliyyəti və ya xüsusi anticismlər tərəfindən tanınmaq qabliyyəti kimi yüksək dərəcədə fərqlənən xüsusiyyəti üzrə aparılır. Sınaq yoxlama kifayət qədər sadə və tez olmalıdır ki, yoxlama aparılan zaman maraq daxilində olan zülallın mümkün olan denaturasiyası, və ya parçalanması baş verməsin və imkan daxilində səhvlərə yol verilməsin. İstənilən təmizləmə sxeminin məqsədi verilmiş zülaldan tədqiqat üçün kifayət edən miqdarda alınsın; beləliklə sınaq yoxlama kifayət qədər həssas olmalıdır ki, alınan materialın yalnız kiçik miqdarı bu sınaqda sərf olunsun. Çox stifadədə olunan əksər zülal sınaq yoxlamaları 10^{-9}-10^{-12} q materialın olmasını tələb edir.

Xromogen Fermentativ Reaksiyalar Çox sınaq yoxlamalar zülalların bəzi funksional aspektlərini aşkar etmək üçün hazırlanmışdır. Məsələn, fermentativ fəallığın təyini substratın azalmasının və ya reaksiya məhsulunun formalaşmasının ölçülməsi ilə həyata keçirilir. Bəsi fermentativ sınaq yoxlamalarında, reaksiyanın gedişi zamanı rəngini dəyişən xromogen substratlardan istfadə edilir. (Bəzi substratlar təbii olaraq xromogendirlər, əgər onlar xromogen deyillərsə onları xromogen molekullara qoşmaq olur.) Fermentin öz substratına olan spesifikliyinə əsasən, yalnız ferment olan nümunələrdə xromogen substratın iştirakı ilə reaksiyanın rəngi dəyişəcək, reaksiyanın gediş sürəti mövcud olan fermentin miqdarını hesablamağa imkan verəcək. Xromogen reaksiyanı kataliz edən ferment həmçinin anticismlərlə qovuşa və ya onlarla kimyəvi birləşə bilir və anticismlə birlışmiş antigenin olmasının və lokalizasiyasının "bəyan" olunmasında istifadə edilir (bax aşağıda).

Anticism sınağı Yuxarıda qeyd olunduğu kimi, anticismlərin antigenlərə xarakterik sıx şəkildə birləşmək kimi fərqli bir xassəsi vardır. Nəticədə, maraq antigen zülalını tanıyan anticismlərin preparatı yaradıla bilər və zülalın istər başqa zülalların kompleks qatışığında olmasını (samanlıqda iynə axtaran kimi), istərsə də xüsusi zülalların qismən təmizlənmiş preparatlarında mövcudluğunu təyin rtmək üçün istifadə oluna bilər. Anticism molekulu əsasən hədəf zülalın (antigenin) anticism ilə molekulyar komplementarlıq əmələ gətirən yalnız kiçik bir hissəsinə sıx şəkildə birləşir. Hədəf zülalın anticism birləşdirən bu rayony **anticismin doğma epitopu** və ya sadəcə olaraq **epitiop** adlanır. Antigenin mçövcud olmasını anticismi fermentlə, floressent molekulla və ya radioaktiv izotopla nişanlamaqla aşkar etmək olar, bunlar da müvafiq olaraq fermentativ sınaq yoxlama, fluoressent mikroskopiya və ya spektroskopiya, və ya radiasiyanın aşkar olunması ilə təyin edilə bilər. Məsələn, işıqsaçan böcəklərdə və bəzi bakteriyalarda olan lüsiferaza fermenti anticismlərə birləşdirilə bilir. ATP-nin və substrat lüsiferinin iştirakı ilə lusiferaza işıq saçan reaksiyanı kataliz edir. İstənilən halda, anticism maraq daxilində olan zülala (antigenə) birləşdikdən sonra birləşməyən anticism yuyulmaqla uzaqlaşdırılır, birləşmiş fermentin substratı əlavə olunur və əmələ gələn rəng dəyişməsi və ya işıq saçması aşkar edilir. İntensivlik fermentlə birləşmiş anticismin miqdarına və beləliklə nümunədə antigenin miqdarına mütənasib olacaqdır. Alternativ olaraq, nişanlanmamış birinci (və ya əsas) anticism hədəf antigenə birləşdikdən sonra, birinci anticismi tanıyan nişanlanmış ikinci anticismdən, birinci anticismin öz hədəfi ilə birləşmiş vəziyyətdə olan kompleksinə birləşmək üçün istifadə edilir. Birinci və ikinci anticismin belə bir kombinasiyası (bəzən anticismlərin "sandviçi" adlanır) hədəf zülalın tapılmasında yüksək həssaslığa malik olur, nişanlanmış ikinci anticism çox hallarda birinci anticismlərə müxtəlif saytlarda birləşə bilən anticismlər qatışığı olduğundan, birinci anticismi nişanlamaqdan daha güclü siqnala malik olur. Yadda saxlamaq çox vacibdir ki, anticism hədəf zülalda yalnız öz doğma epitopunu tanıyır və ona birləşir. Əgər həmin epitop məsələn, zülal bükülməsinin qismən pozulması ilə və ya posttranslyasiya modifikasiyası zamanı dəyişmişsə və ya antigen zülal başqa molekula birləşməklə blok olnmuşsa, anticism birləşməsi ya azalacaq ya da tamamilə yox olacaq. Beləliklə, anticismin birləşməsi olmadıqda demək lazım deyil ki, nümunədə antigen yoxdur, antigendə yalnız anticismin birləşə bilməsi üçün epitop hissə mövcud deyil.

Zülalın anticismlərini yaratmaq üçün (Fəsil 23-də ətraflı müzakirə edilir) intakt zülal (antigen) və ya bu zülalın fraqmenti heyvanın daxilinə yeridilir (inyeksiya edilir) (adətən dovşan, siçan və ya keçinin). Bəzi hallarda, maraq zülalının a.t. ardıcıllığına uyğun olan 10-15 a.t. qalığından ibarət olan qısa sintetik peptid anticismin əmələ gəlməsini induksiya etmək üçün antigen kimi istifadə olunur. Bu cürə sintetik peptid heyvan orqanizmində böyük zülül daşıyıcıları ilə cütləşdikdə heyvan orqanizmində, tam ölçülü təbii zülülda həmin peptid hissəyə (epitopa) birləşə bilən anticismin istehsal olunması induksiya olunur. Biosintetik və ya kimyəvi yolla epitopun yaxın olmayan başqa bir zülala birləşdirilməsi ***epitop yarlıqlama (epitop tagging)*** adlanır. Bu kitab boyunca, biz görəcəyik ki, istər peptid epitoplardan, istərsə də intakt zülallardan istifadə etməkıə yaradılmış anticismlər zülalların ayrılması, təyin edilməsi və xarakterizə olunması üçün son dərəcə geniş imkanlara malik olan universal reagentdir.

Yaşıl Fluoressent Zülalın Qoşulmasıyla Zülalların Aşkarlanması Hüceyrə daxilində spesifik zülalların təyun edilməsində epitop yarlıklamaya alternativ olan xüsusi əhəmiyyət kəsb edən, meduzalarda tapılmış, təbii fluoressent olan (bax Şəkil 4-16) *yaşıl fluoressent zülalın* (*GFP*) istifadə edilməsidir. Həm maraq zülalına həm də bir polipeptiddə ona qoşulmuş GFP zülalına malik olan ximer zülal, kombinasiya olunmuş zülalı kodlaşdıran genin hüceyrəyə keçirilməsi ilə ekspressiya olunur. Ximer zülalın miqdarı və hüceyrə daxilində paylanması asanlıqla təyin edilə bilir. Bu ximer zülal yanaşması Fəsil 4-də təsvir edilir.

Zülalların Geldə Təyin Olunması Gelə yüklənmiş zülallar adətən görünməz vəziyyətdə olurlar. Geldə zülalların təyin olunması üçün iki əsas yanaşma vardər, ya zülalların geldə olduğu vəziyyətdə yarlıklanması və ya rənglənməsi, ya da zülalların elektroforetik yolla geldən nitroselluloza və ya polivinilidən difloriddən hazırlanmış membranlara keçirilməsi və sonra membranda təyin edilməsi. Zülallar gel daxilində adətən üzvi rəngləyicilərlə və ya gümüş-əsaslı rəngləyici ilə boyanır, hər ikisi ya görünən normal işıqla, ya da xüsusi təyinedici avadanlığı tələb edən fluoressent rəngləmələrlə təyin

oluna bilir. Koumassi göy ən çox istifadə olunan üzvi rəngləyicidir, adətən təxminən 1000 nq zülalın təyin olunmasında istifadə olunur, təyin etmənin aşağı limiti 4-10 nq-a qədərdir. Gümüşlə rənglənmə və ya fluoressent rənglənmə daha həssasdır, aşağı rəngləmə limiti ~1 nq-dır. Koumassi göyü və başqa rəngləyicilər həmçinin zülalları membrana keçirdikdən sonra zülalların təyinində istifadə oluna bilər, amma zülallların bu membranlara keçirilməsindən sonra təyin olunmasında ən çox istifadə olunan metod immunoblottunqdir.

Eyni zamanda, Vestern blottinq kimi də adlandırılan immunoblottinq, zülalların gel elktroforezi ilə ayrılmasının imkanlarını və onların anticismlərə olan spesifikliyini özündə cəmləyir. Bu çoxmərhələli proses, zülalların ayrılması və sonra maraq daxilində olan spesifik zülalın təyinində çox istifadə olunan metoddur. Şəkil 3-41-də göstərildiyi kimi, bu metodda iki müxtəlif anticismdən istifadə olunur, onlardan biri maraq zülalına spesifikdir (birinci anticism), ikinci anticism isə birinci anticismə birləşərək onun (və beləliklə maraq daxilində olan zülalın) təyin edilməsinə imkan verən başqa molekul və ya fermentlə əlaqəli olan anticismdir. İkinci anticismin birləşdiyi fermentlər ya görünə bilən rəngli məhsul əmələ gətirir ya da ***kimyəvi lüminessensiya*** adlanan işıqlanma yaradır ki, bunu da asanlıqla həssas detektorlarda və ya rentgen plyonkalarına köçürmək olur. İmmunoblottink eksperimentlərinin nəticələrinin nümunələri ilə Şəkil 15-10-da tanış olmaq olar. Bəzən "sandviç" adlandırılan iki müxtəlif anticism, siqnalların amplifikasiyasında və həssaslığın artırılmasında (yaxşılaşdırılmasında) istifadəı olunur. Əgər maraq zülalına olan anticism əldə etmək mümkün deyilsə, amma zülalı kodlaşdıran geni əldə etmək mümkündürsə, o zaman zülal rekombinant DNT metodu ilə (bax Fəsil 5) kiçik peptid epitop zülalın normal ardıcıllığında birləşdirilə bilər (***epitop yarlıqlama***) və həmin epitop üçün spesifik olan kommersiya yolu ilə əldə olunan anticismlərlə təyin edilə bilər.

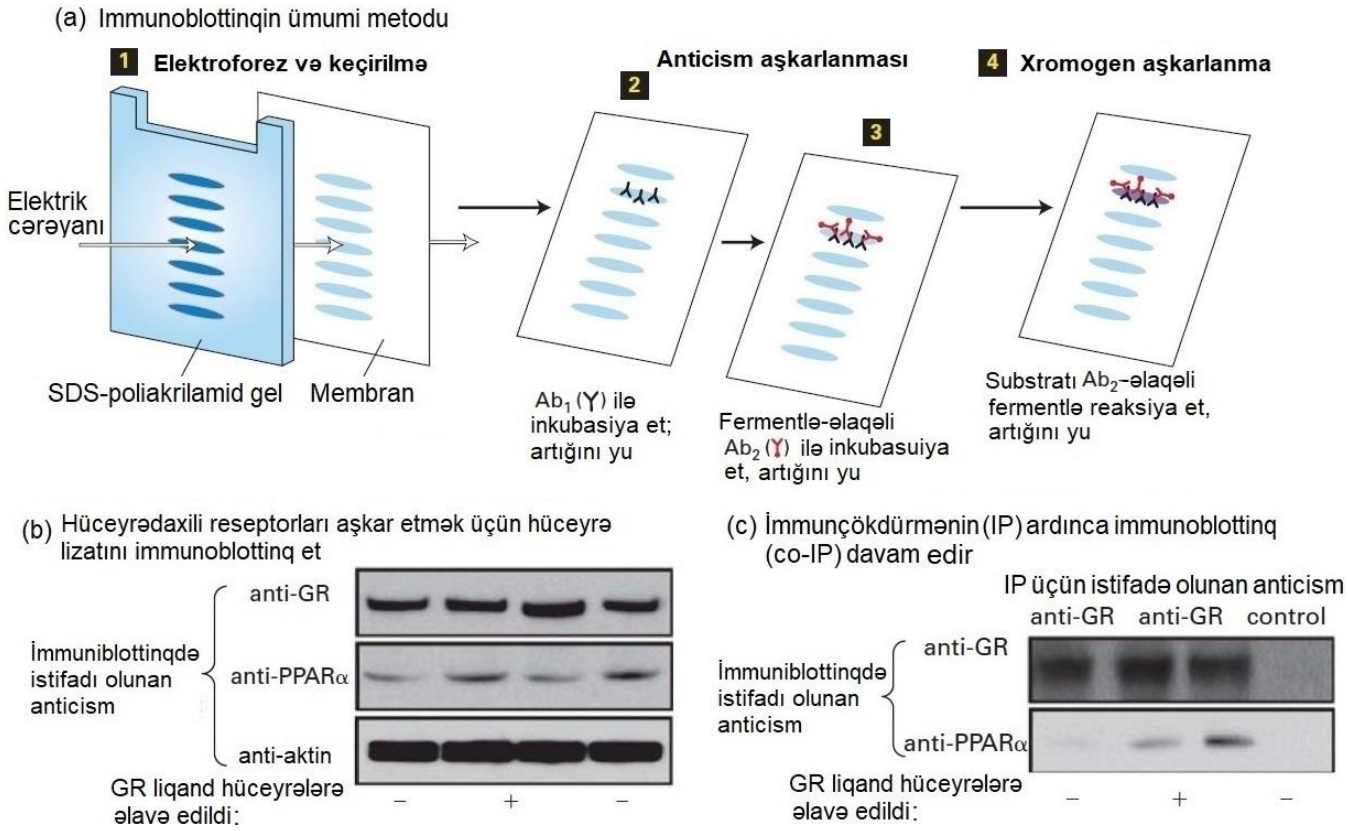
İmmunçokdürmə İmmunçokdürmə çox zaman (**Immunoprecipitation**) **IP** kimi qısaldılıb verilir, mürəkkəb qatışıqlarda, məsələn, qan nümunəsindən və ya hüceyrə nümunəsindən ekstraksiya olunmuş ümumi zülal qatışığında maraq zülalını başqa molekullardan ayırmaq üçün anticismlərin spesifikliyi istifadə edilir. Maraq zülalına olan anticism nümunə qatışığına əlavə edilir və anticismin hədəf zülalında epitopa birləşməsinə vaxt verilir. Sonra anticismə birləşən maddə (agent) anticismin və onunla birləşmiş hədəfin məhluldan çökməsinə səbəb olmaq üçün əlavə edilir, çöküntü isə sentrifuqalama yolu il ayrılır. Bu metodun dəqiq nümunəsi Fəsil 15-də təsvir edilmişdir. Sonra, anticismi zülaldan ayırmaq üçün çöküntü denaturasiyaedici şraitdə, məsələn tərkibində detergent olan buferlə həll olmuş vəziyyətə gətirilir və artıq immunçökdürülmüş hədəf zülal analiz oluna bilər. Əgər immunçökdürülmüş hədəf zülal bir və ya daha artıq molekulla daha möhkəm birləşmişsə, o zaman bu zülallar da maraq zülalı ilə birlikdə çökdürüləcəkdir (*koimmunçökdürmə*, çox zaman *co-IP* kimi qısaldılır). Co-IP metod çox hallarda supermolekulyar komplekslərin dördüncü quruluşunun identifikasiya və xarakterizə olunmasında istifadə edilir.

Radioizotoplar Bioloji Molekulların Təyin Olunmasında Əvəzolunmaz Üsullardır

Zülalların və ya başqa bioloji molekulların izlənməsinin həssas metodu molekul daxilinə yerləşdirilmiş radioizotoplardan buraxılan radioaktivliyin tutlub ölçülməsidir. Radionişanlanmış molekullarda ən azı bir atom **radioizotop** adlanan radioaktiv formada olur.

Radioizotoplar Bioloji Tədqiqatlarda Əhəmiyyətlidir Müxtəlif radioizotoplarla nişanlanmış yüzlərlə bioloji molekullar (məsələn amin turşuları, nukleozidlər və çoxsaylı metabolik aralıq məhsullar) kommersiya yolu ilə əldə oluna biləndir. Bu preparatlar, vahid materialda radioaktivliyin miqdarı ilə ölçüləın *spesifik fəallıqlarına* görə kifayət qədər fərqlənirlər bu da, bir millimolda bir dəqiqə ərzində parçalanma (**dpm** - disintegration) ilə ölçülür. Nişanlanmış komponentin spesifik fəallığı onun ***yarımparçalanma-dövrü***ndən, bu atomların yarısının radioaktiv parçalanması üçün tələb ilunan zaman müddətindən asılıdır, bu zaman aşkar ediləcək dərəcədə radiasiya ayrılır. Ümumiyyətlə radioizotopun yarım-parçalanma dövrü nə qədər qısa olarsa onun spesifik fəallığı daha yuxarı olur (Cədvəl 3-1). Nişanlanmış birləşmənin spesifik fəallığı kifayət qədər yuxarı olmalıdır ki, onun emissiya edən (ayrılan) radiasiyasını dəqiq təyin etmək mümkün olsun.

Hüceyrələrdə makromolekulların (zülalların, RNT-nin, DNT-nin) radionişanlanmasında çox istifadə olunan yanaşma radionişanlanmış biosintetik sələflərin [məsələn, ^{3}H- və ya ^{35}S-nişanlanmış amin turşularının, ^{32}P-nişanlanmış fosfatın (^{32}P-nişanlanmış ATP üçün sələfiin) və ya ^{3}H-nişanlanmış nuklein turşusu sələflərinin, məsələn deoksitimidinin (həmçinin sadəcə olaraq timidin adlanır) və ya ^{32}P-nişanlanmış fosfatın] hüceyrəxarici mühitə əlavə olunmasıdır. Bu sələflər hüceyrəyə transporterlər (daşıyıcılar) vasitəsilə daxil edilir (bax Fəsil 11) və hüceyrə tərəfindən yeni sintez olunan makromolekullara birləşdirilir (bax Fəsil 5). Məsələən, kükürd-35-lə (^{35}S) nişanlanmış metionin və sistein hüceyrədə biosintez yolu ilə zülalları nişanlamaq üçün geniş istifadə olunur, çünki bu amin turşularının yüksək xüsusi fəallığa malik olan (>10^{15} dpm/mmol) preparatları asanlıqla əldə olunandır. Hüceyrə daxilində (və ya in vitro istifadə olunan) kinazalar ^{32}P-nişanlanmış fosfatı ^{32}P-nişanlanmış ATP-dən nişanlanan fosfozülallara keçirə bilirlər. Eləcə də, kommersiya yolu ilə hazırlanmış ^{3}H-nişanlanmış nuklein turşusu sələfləri ^{14}C-nişanlanmış preparatlarla müqayisədə çox-çox yüksək xüsusi fəallığa malik olurlar. Eksperimetlərin çoxunda, əvvəlki daha məqsədəuyğundur, çünki onlar RNT və ya DNT-yə imkan verirlər ki, qısa zaman müddətindəki birləşmə (inkorporasiya) prosesində kifayət qədər nişanlansınlar və ya daha az hüceyrə nümunələrini tələb edirlər. Tərkibində fosfor atomu radioizotop fosfor-32 ilə nişanlanmış fosfatlara malik olan müxtəlif birləşmələr asanlıqla tapılandır. Yüksək xüsusu fəallığa malik olduqlarından ^{32}P-nişanlanmış nukleotidlər hüceyrədən kənar sistemlərdə nişanlanmış nuklein turşularının hazırlanmasında geniş istifadə olunurlar.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 3-41 İmmunoblottinq (IP və ya Vestern blottinq) və ko-immunçökdürmə (co-IP) spesifik zülalları və onların birləşdiyi partnyorları aşkar edə bilir. (a) İmmunçökdürmə metodu. Pillə 1: Zülal qatışığı SDS gelində elektroforez olunduqdan sonra ayrılmış bəndlər (və ya iki-ölçülü gelin ləkələri) geldən porlu membrana keçirilmişdir (blott olunmuşdur), və buradan onların çıxarılaması o qədər də asan deyil. Fərdi zülallar (mavi ovalla göstərilmişdir) bu mərhələdə görünməzdir. Pillə 2: Membran öyrənilən zülala spesifik olan anticism məhlulu (Ab_1) ilə örtülmüşdür və onun müəyyən zaman müddətində inkubasiyasına imkan verilmişdir. Ab_1 membrana bağlanmış istənilən başqa zülala deyil yalnız spesifik maraq zülalına birləşir (yuxarıdan ikinci) və anticism molekulunun layını əmələ gətirir (onun vəziyyəti indiki halda görünə bilmir). Sonra, birləşməmiş Ab_1-i uzaqlaşdırmaq üçün membran yuyulur. Pillə 3: Membran ikinci anticismlə (Ab_2) inkubasiya olunur, bu xüsusi olaraq birinci anticismi (Ab_1) tanıyıb ona birləşir. İkinci anticism kovalent rabitə ilə ya, xromogen reaksiyanı (məsələn kemolüminessesnsiya) kataliz edən fermentə, radioaktiv izotopa və ya mövcudluğu yüksək həssaslıqla təyin oluna bilən başqa molekula birləşir. Pillə 4: Nəhayət sonda, birləşmiş Ab_2-nin miqdarı və lokalizasiyası təyin olunur (xromogen reaksiyadan əmələ gələn tünd bənövşəyi çöküntü ilə və ya kemolüminessesnsiya ilə buraxılan işığın rentgen plyonkalarında tutulması ilə), öyrənilən zülalın elektroforetik mobilliyinin (və ona görədə onun kütləsinin) və miqdarının (bəndin intensivliyinə əsasən) təyin olunmasına imkan verir. (b) İmmunoblotting hüceyrədaxili reseptorların və reseptorlardan birinin liqandlara məruz qalmansının təsirini aşkar etmək üçün istifadə edilmişdir. Bu eksperimentdə, qırmızı qan hüceyrələrinin sələfi olan hüceyrələr petri qablarında in vitro saxlanılmış və sonra, liqand olmadan (–, ən soldakə və ən sağdakı xətlər) və ya qlikokortikoid reseptorun GR birləşdirən liqandı olmaqla (+, orta xətt) təsir edilmişdir. Ardınca, hüceyrələr detergentdə dağıdılmış (lizis) və üç anticismdən – GR ilə birləşən (anti-GR), PPR_α adlanan qlikokortikoid reseptora birləşən (anti-PPR_α) və ya zənginliyinin liqandla birləşməyə təsir etməsi gözlənilməyən zəngin hüceyrədaxili zülal aktinə birləşən anticismlərdən istifadə edərək total lizat üzərində immunoblotting (Vestern blotting) prosesi yerinə yetirilmişdir. Anti-aktin anticismindən istifadə etməklə (aşağı boksda) aşkar edilmiş immunoblottinq bəndlərinin bərabər intensivliyi, "yükləmə nəzarətini" təmin dir, və göstərir ki, hər bir gel xəttinə bərabər miqdarda hüceyrə lizatı yüklənmişdir. Hüceyrənin əvvəlcədən GR liqandla inkubasiya olunması ilə və ya inkubasiya olunmadan GR, PPR_α-ın təxminən bərabər intensivlikləri göstərdilər ki liqand bu zülalların heç birinin miqdarını hüceyrədə əhəmiyyətli dərəcədə dəyişmədi. (b) hissəsindəki immunoblottinqdə istifadə olunan eyni hüceyrə lizatlarının bir hissəsi (c) hissəsində göstərilən immunçökdürmə/immunioblottinqdə istifadə olunmuşdu. (c) Həm GR həm də PPR_α-ya malik olan stabil kompleksin əmələ gəlməsinin GR liqandla induksiya olunmasını təyin etmək üçün immunçökdürmə (IP) ardınca davam edən immunoblottinqlə (birlikdə co-IP adlanır) istifadə edilmişdi. Hüceyrə lizatının bir hissəsi GR-ın anticismi ilə (sol və orta xəttlər) və ya GR həm də PPR_α ilə birləşə bilməyən nəzarət anticismlə (sağ xətt) immun çökdürülrmüşdür. İmmun çöküntülər hüceyrə lizatının qalan hissələrindən sentrifuqa yolu ilə ayrılmış, anti-GR (yuxarı boks) və ya anti-PPR_α-dan (aşağı boks) istifadə edərək immunoblottinqlə analiz olunmuşdur. Gözlənildiyi kimi, yuxarı boks göstərir ki, eyni anti-GR anticism immunoblottinqdə istifadə edilərkən GR zülal nəzarət anticismi ilə (bənd müşahidə edilmir) yaranmış çöküntüdə deyil, α-GR-dan istifadə etməklə yaranmış immun çoküntülərdə aşkar edilmişdir. Çox maraqlıdır ki, immunçöküntülərin anti-$PPAR_\alpha$ anticismlə immunoblottinqi aparılanda (aşağı boks) $PPAR_\alpha$-nın əhəmiyyətli dərəcədə miqdarı GR ligand mövcud olarkən görünmüşdür (mərkəzi xətt), halbuki GR liqand olmayan halda (sol xətt) və ya nəzarət immunçöküntü olan halda (sağ xətt) çox az ko-çöküntü müşahidə edilir. Bu nəticələr göstərir ki, GR liqand həm qlikokortikoid reseptorun həm də PPR_α zülalların iştirak etdiyi kompleksin yaranmasını induksiya edir. Bu nəticələr GR və PPR_α zülların GR liqand mövcud olan halda bir-biri ilə birbaşa əlaqədə olub olmamasını və ya liqand mövcud olarkən kompleksdə GR və PPR_α zülalları sıx şəkildə bir yerdə saxlayan aralıq intermediat kimi fəaliyyət göstərən başqa molekulların mövcud olmasını müəyyən etmir. [(b) və (c) hissələri Macmillan Publishers Ltd, razılığı ilə Lee, H.Y. et al., "PPAR-*α* and glucocorticoid receptor synergize to promote erythroid progenitor self-renewal," *Nature*, 2015, **522**:474–477-dən yenidən çap olunur.]

Normal atomun radioizotopla əvəz edildiyi nişanlanmış komponentləri kimyəvi xüsusiyyətlərinə görə uyğun nişanlanmamış komponentlərdən virtual olaraq fərqlənmir. Ona görə də, məsələn, fermentlər tərkibində nişanlanmış atom olan və nişanlanmış atom olmayan substratları fərqləndirə bilmir. Belə radioaktiv atomların molekulda olması, izotop mötərəzədə (defissiz) prefiks (məsələn, [^{3}H]leysin) kimi göstərilir. Bunun əksinə, demək olar ki, istənilən biomolekulun (zülalın və ya nuklein turşusunun) yod-125 (^{125}I) ilə nişanlanması, normal halda quruluşunun tərkib hissəsi kimi yoda malik olmayan molekula kovalent ^{125}I-in əlavə olunması tələb olunur. Bu nişanlama prosesi kimyəvi quruluşu modifikasiya etdiyindən, nişanlanmış molekulun bioloji fəallığı nişanlanmamış molekulunkindən müəyyən qədər fərqlənə bilər. Bu cürə radioaktiv atomların olması izotop prefiks kimi (mötərəzəsiz) defislə göstərilir (məsələn ^{125}I-tripsin). Zülalların ^{125}I ilə nişanlanmasının standart metodu ^{125}I-in kovalent rabitə tirozinin yan zəncirinin əsas aromatik həlqəsinə birləşməsinə səbəb olur (mono- və di-yodtirazin). Qeyri radioaktiv izotoplar hüceyrə biologiyasında geniş istifadə olunmaqdadır, xüsusən də nüvə maqnit rezonans tədqiqatlarında və həmçinin aşağıda müzakirə olunan mass spektroskopiya tədqiqatlarında.

Nişanlama Eksperimetləri və Radionişanlanmış Molekulların Təyin Olunması Eksperimentin təbiətindən asılı olaraq, nişanlanmış birləşmənin **avtoradioqrafiya** – nümunənin iki-ölçülü detektorda (fotoqrafik emulsiya və ya elektron detektor) aşkar edilməsi ilə, və ya onların radioaktivliyinin **müvafiq "sayğacda"** ölçülməsi ilə nümunədə nişanlanmış birləşmənin miqdarı böyük dəqiqliklə təyin edilə bilər.

Cədvəl 3-1 Bioloji Tədqiqatlarda Ümumi Istifadə Olunan Radioizotoplar

İzotop	Yarım-parçalanma dövrü
Fosfor-32	14.3 gün
Yod-125	60.4 gün
Kükürd-35	87.5 gün
Tritium (hidrogen-3)	12.4 il
Karbon-14	5730.4 il

Avtoradioqrafiyanın bir istifadəsində, toxuma, hüceyrə, və ya hüceyrənin tərkib hissəsi radioaktiv molekulla nişanlanır, birləşməməş radioaktiv material yuyularaq uzaqlaşdırılır və nümunənin quruluşu ya makromolekulların nümunədə kimyəvi yolla çarpaz-əlaqələndirilməsi ilə (fiksasiya) ya da onu dondurmaq yolu ilə stabilləşdirilir. Sonra nümunənin üzəri radiasiyaya həssas fotoqrafik emulsiya ilə örtülür. Emulsiyanın görüntülənməsi, adətən mikroskop altında aşkar edilən, paylanması radiaktiv materiala uyğun gələn kiçik gümüşü dənələri üzə çıxardır. Bütöv hüceyrənin avtoradioqrafiik tədqiqatları müxtəlif makromolekulların sintez olunduğu müxtəlif mərkəzlərin təyinində və uyğun olaraq hüceyrə daxilində bu maktpomolekulların yerdəyişmələrinin izlənməsində həlledici əhəmiyyətə malik olmuşdur. Fəsil 4-də təsvir olunmuş, fluoressent mikroskopun istifadə olunduğu müxtəlif metodlar bu tipli tədqiqatlar üçün avtoradioqrafiyanı geniş şəkildə sıxışdırıb aradan çıxarır. Amma, avtoradioqrafiya bəzi hallarda, ayrılmış xüsusi DNT və RNT ardıcıllıqlarının spesifik toxumalarda lokalizasiyasını öyrənmək üçün (bax Fəsil 6) istifadə olunan in situ kimi tədqiqt metodlarında istifadə edilir.

Nişanlanmış materialda radioaktivliyin miqdarının kəmiyyət ölçmələri müxtəlif cihazlarla həyata keçirilir. Qayker (Geiger) sayğacı, radioizotopdan buraxılmış β zərrəcikləri və ya γ şüaları vasitəsi ilə qazda yaranan ionları sayır. Bu cihaz əsasən əldə istifadə olunan alət olub, tədqiqatçıları artıq radiasiyanın təsirindən qorumaq üçün laboratoriyada radioaktivliyin monitorinqində istifadə olunur. Ssintilyator sayğacında radioaktiv nişanlanmış nümunələr, işıq saçan fluoressent komponentə malik olan maye ilə qarışdırılır, radioizotoplar parçalanarkən β zərrəciklərin və ya γ şüaların buraxdığı enerjini ssintilyator qəbul edib işıq qığılcımları şəkilində fluoressensiya edir, cihazdakı fototyub bu işıq qığılcımlarını aşkar edib sayır. Fosforimagerlər iki-ölçülü arrey detektorlardan istifadə etməklə radioaktivliyin aşkar olunmasında istifadə olunur, parçalanmanın (decay) miqdarı haqqında rəqəmsal məlumatı bir dəqiqədə dezinteqrasiya (dağılma) miqdarı kimi ("disintegrations per minute") səth zonasında xırda piksellərdə yerləşdirir. Təkrar-istifadə olunan elektron film kimi baxıla bilən bu cihazlar, gel-elektroforez yolu ilə ayrılmış radioaktiv molekulların miqdarını təyin etmək üçün və bu məqsədlə fotoqrafik emulsiyanı əvəz edə bilən, çox istifadədə olunan metoddur.

Nişanlama və biokimyəvi metodların vizual və kəmiyyət təyin etmə metodları ilə kombinaiyası nişanlanma eksperimentlərində istifadə olunur. Məsələn, xüsusi bir hüceyrə tipi tərəfindən sintez olunan əsas zülalları identifikasiya etmək üçün hüceyrə nüminəsi radioaktiv amin turşusu (məsələn, [^{35}S]metionin) ilə bir neçə dəqiqə ərzində inkubasiya olunur, bu meddət ərzində nişanlanmış amin turşusu hüceyrəyə daxil olur və hüceyrənin nişanlanmamış amin turşuları cəminə qarışır və nişanlanmış amin turşularından bəziləri biosintez yolu ilə yeni sintez olunmuş zülallara daxil olur. Sonra birləşməmiş radioaktiv amin turşuları yuyularaq hüceyrədən uzaqlaşdırılır. Hüceyrələr toplanır və hüceyrənin zülallar qatışığı hüceyrədən ekstraksiya olunur (məsələn detergen məhlulu ilə) və çox istifadə olunan metodların biri ilə zülalların kompleks qatışığı individual komponentlərə qədər ayırılır. Adətən bu məqsədlə gel-elektroforezi avtoradioqrafiya ilə, və ya fosforimager analizi ilə kombinasiyada seçilir. Geldəki radioaktiv bənd, radioaktiv nişanlanmış amin turşusunun birləşdiyi yeni sintez olunmuş zülaladır. Yeni sintez olunmuş radioaktiv nişanlanmış zülallar ansambılı içərisində maraq daxilində olan spesifik zülalı təyin etmək üçün zülalın spesifik anticismindən istifadə edərək bu zülalı nümunədəki başqa zülallardan çökdürməklə (immun-çökdürmə metodu) ayırmaq olar. Sonra, anticismi zülaldan ayırmaq üçün çöküntü denaturasiya edici şəraitdə, məsələn tərkibində SDS olan buferdə həll edilir və nümunə SDS-PAGE və ardınca gələn avtoradioqrafiya metodu ilə analiz olunur. Bu tip eksperimentdə, elektroforezlə ayrılma prosesi başa çatdıqdan sonra radiasiya ilə fəallaşmış fluoressent birləşmə ("ssintilyator") gelə qatıla bilər (dəmləmə yolu ilə) və radioaktiv parçalanmadan ayrılan qığılcım işıqla nişanlanmış zülalı ya rentgen filmi üzərində ya da iki-ölçülü elektron detektorla tapmaq olar. Belə bir nümunə aşağıda gtöstərolmişdir (Şəkil 3-

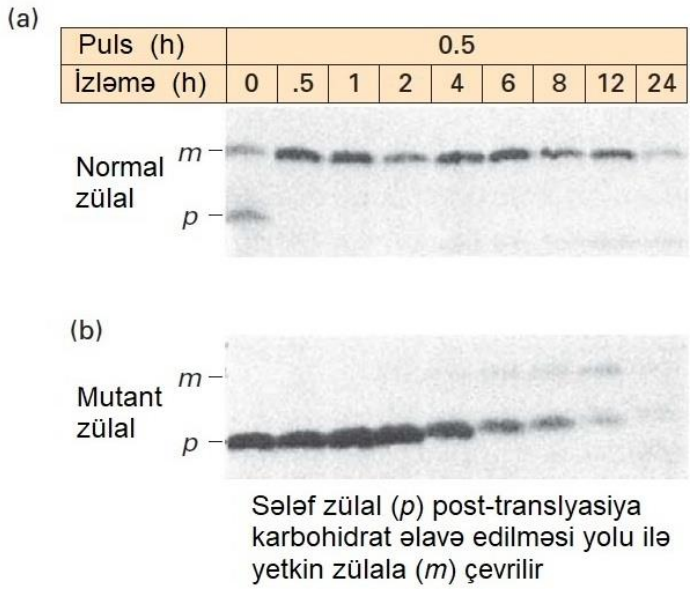
42). Bu metod xüsusən ^{3}H kimi zəif β ayrılmalar zamanı əhəmiyyətlidir.

Pulsla-izləmə təcrübələri, zülalların hüceyrədaxili lokalizasiyalarında və ya zülalların və metabolitlərin zaman keçdikcə modifikasiyalarını izləmək üçün xüsusən əhəmiyyətlidir. Bu təcrübə protokolunda, hüceyrə nümunələri, hüceyrədə maraq daxilində olan molekullara qısa zaman daxilində birləşə və ya qoşula bilən -"puls" - radio-nişanlanmış birləşmələrə məruz qoyulur. Birləşməmiş radioaktiv molekullar yuyularaq uzaqlaşdırılır və sonra hüceyrələr qalmış olan istənilən radioaktıv molekulları durulaşdırmaq üçün eyni, amma nişanlanmamış molekulların yüksək miqdarına maruz qaldıqda "puls" başa çatır. Bu prosedur "puls" dövründən sonra yüksək miqdarda radionişanlanmış molekulların birləşməsinin qarşısını alır, və "izləmə" dövrünü inisiasiya edir (Şəkil 3-42). İzləmə dövründə vaxtaşırı götürülmüş nümunələrdə, radionişanlanmış molekulların fəaliyyətdə olduğu zaman müddətindəki yerləşməsini və ya kimyəvi formasını təyin etmək üçün sınaq analizləri aparılır. İmmun-çokdürmə və ardınca gələn SDS-PAG elektroforezindən sonra avtoradioqrafiya yolu ilə təyin olunan zülalların pulsla-izləmə təcrübələri tez-tez hallarda, puls dövründə radioaktiv amin turşusu sələflərini əlavə etməklə və sonra izləmə dövründə radioaktiv zülalların miqdarını və xüsusiyyətlərini təyin etməklə, zülalların sintezi, modifikasiysı və parçalanma sürətini izləmək üçün istifadə olunur. Beləliklə, zülalın elektroforetik mobilliyini və parçalanma dərəcəsini dəyişən sintezdən sonrakı modifikasiyalarını müşahidə etmək olar ki, bu da spesifik zülalın izləmə vaxtının uzanması ilə siqnalın itməsi kimi təyin olunur. Puls-izləmə metodunun avtoradioqrafiya yolu ilə klassik istifadəsi endoplazmatik şəbəkədə ifraz olunmuş zülalların öz sintez mərkəzindən hüceyrə səthinə qədər kəsib keçdiyi yolun öyrənilməsi üzrə tədqiqatlar olmuşdur (bax Fəsil 14).

Mass Spektrometriya Zülalların Kütləsini və Ardıcıllıqlarını Təyin Edə Bilir

Mass spektrometriya (MS) zülalların xarakterizə olunması üçün, xüsusən də zülalların və ya zülal fraqmentlərinin kütləsinin təyini üçün çox güclü metoddur. Belə məlumata malik olmaqla zülalın hissələrini və ya bütöv zülalın ardıcıllığını da təyin etmək mümkündür. Bu metod, yüklənmiş molekulun (molekulyar ionun) kütləsinin (***m***) onun yükünə (***z***) olan nisbətini (***m/z*** nisbəti) yüksək dərəcədə dəqiq, birbaşa təyin etməyə imkan verir. Sonra əlavə metodlar nolekulyar ionların mütləq kütləsini təyin etmək üçün istifadə olunur.

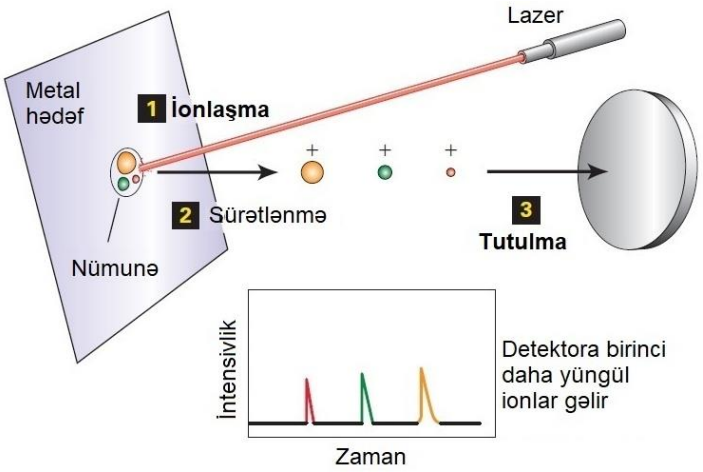
Bütün mass spektrometrlərin dörd əsas xüsusiyyəti vardır. **Birinci,** yükün adətən protonlar şəkilində tədqiqat altında olan peptid və ya zülal molekuluna ötürüldüyü **ion mənbəidir** (ionlaşma). Yükün ionlara çevrilməsi yüksək elektrik sahəsinin iştirakı ilə baş verir, sonra isə bu elektrik sahəsi yüklənmiş molekulyar ionları **ikinci əsas komponentə, mass analizatora** yönəldir. Həmişə yüksək vakum altında olan kameradan ibarət olan mass analizator ionları fiziki olaraq onların fərqli kütlədən-yükə (*m/z*) nisbətinə əsasən ayırır. Mass-analizatorda ayrılmış **ionlar sonra detektora tərəf yönəldilir, bu üçüncü əsas komponent** nümunədə ionların hər birinin nisbi bolluğunun ölçülməsini təmin edir. **Dördüncü** əsas komponent cihazı kalibirovka etmək üçün istifadə olunan k**ompüterləşdirilmiş verilənlər sistemidir**; verilənləri əldə etmək, ehtiyatda saxlamaq və alınmış nəticələrin işlənilməsi (prosesi), tez-tez ilkin müşahidələrə əsaslanan, əlavə xüsusi növ məlumatların nümunələrdən toplanması üçün cihazı avtomatik olaraq istiqamətləndirmək. Bu tipli avtomatik geriyə-əlaqə aşağıda təsvir olunan tandem MS (MS/MS) peptid ardıcıllığının oxunması metodları üçün istifadə olunur.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 3-42 Puls-izləmə eksperimentləri zlalların modifikasiyasını və ya hüceyrə daxilində yerdəyişməsini izləməyə imkan verir. (a) Hüceyrədə yeni sintez olunmuş zülalın sonrakı taleyini izləmək üçün, yeni sintez olunmuş zülalları nışanlamaq məqsədi ilə hüceyrələr 0.5 saat müddətində [^{35}S]metioninlə inkubasiya olundular (puls), sonra da hüceyrə daxilində birləşməmiş radioaktiv aminturşular yuyulmaqla uzaqlaşdırıldı. Hüceyrələr 24 saata qədər müddətdə daha da inkubasiya olundular (izləmə) və müxtəlif zaman müddətində hər izləmə dövründə götürülmüş nümunələr, xüsusi bir zülalın yerinin tapılması (lokalizasiyası) üçün immun-çökdürməyə məruz qoyuldu (buradakı aşağı sıxlıqlı lipoprotein reseptordur). İmmun-çökdürmənin SDS-PAG elektroforezindən sonra, ilkin olaraq kiçik sələf (***p***) kimi sintez olunan və sonra, karbohidratların əlavə olunması ilə tez bir surətdə daha böyük yetkin (***m***) formaya modifikasiya olunmuş spesifik zülalın vizuallaşdırılması üçün avtoradioqrafiya tətbiq olunmuşdur. Nişanlanmış zülalların təxminən yarısı puls dövründəki ***p*** formadan ***m*** formaya çevrilmişdir, qalanları isə izləmədən 0.5 saat sonra çevrilmişdir. Zülallar parçalanmağa başlayana qədər 6-8 saat müddətində stabil qalırlar (zülal bəndlərinin intensivliyinin azalması ilə göstərildiyi kimi). (b) Eyni eksperiment zülalın mutant formasının olduğu hüceyrələrlə aparılmışdır. Mutant formalı ***p*** normal şəkildə ***m*** formaya çevrilə bilmir, və o normal zülala nisbətən daha tez parçalanır. [K.F.Kozarski, H.A.Brush, and M.Krieger, 1986, J.Cell.Biol. 102(5):1567-1575. doi: 10.1083/jcb.1025.1567.]

Zülal və zülal fraqmentlərinin ionlarını yaratmaq üçün tez-tez istifadə olunan iki metod (1) **matrisa-köməyi ilə lazer desorbsiya/ionlaşma (matrix-assisted laser desorbtion/ionization - MALDI)** və (2) **elektroçiləmə (elektrospray - ES)** metodlarıdır. MALDI-də (Şəkil 3-43) peptid və ya zülal nümunəsi aşağı-molekul-çəkili, UV-udan üzvü turşularla (matrisa ilə) qarışdırılır və sonra metal hədəf

üzərində qurudulur. Lazerin enerjisi nümunəni ionlaşdırır və buxarlandıraraq onun tərkib molekullarından vahid yüklənmiş molekulyar ionları yaradır. ES-də (Şəkil 3-44a) məhlulda olan peptid və ya zülal nümunələr atmosfer təzyiqi altında dar kapillyardan çilənərək çox xırda damcılardan ibarət olan incə (zəif) dumana çevrilir. Damcılar yüksək elektrik sahəsi olan şəraitdə yaradılır, bu da onların güclü yüklənməsinə səbəb olur. Damcılar mass spektrometr analizatorunun girişində qısa uçuşu (mm) zamanı buxarlanır, zülallardan və ya peptidlərdən çoxyüklü ionları əmələ gətirir. Qazabənzər ionlar MS-in analizator rayonununda nümunələrə keçirilir və sonra elektrik sahəsinin təsiri ilə sürətləndirilir və mass analizator vasitəsi ilə onların ***m/z*** nisbətinə görə ayrılır.



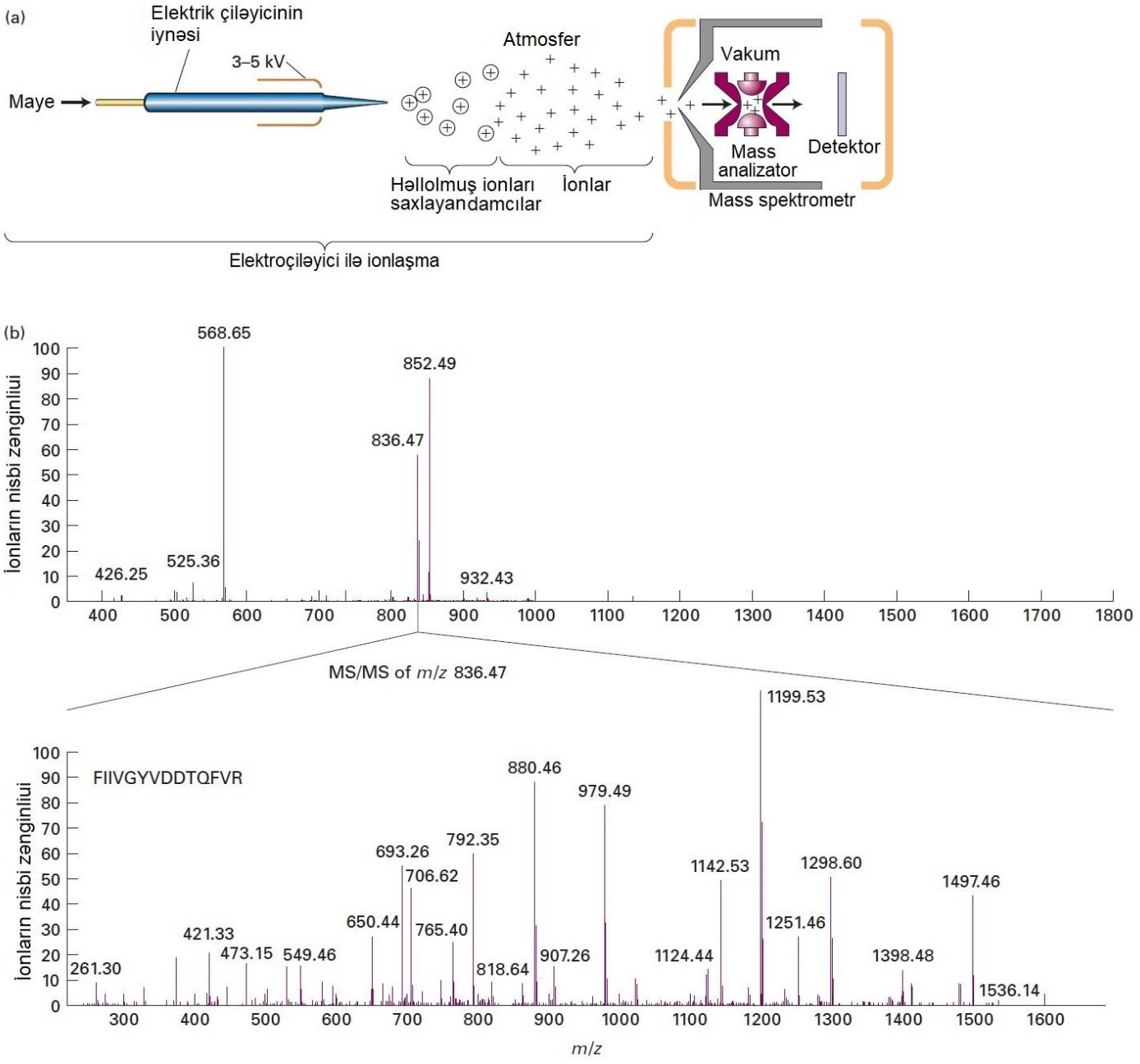
EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 3-43 Molekulyar kütlə matrisa-dəstəkli lazer desorbsiya/ionlaşma uçuş-zamanı (MALDI-TOF) mass spektrometr ilə təyin olna bilir. MALDI-TOF mass spektrometrdə lazerin işıq pulsları metal hədəfə adsorbsiya olunmuş zülalı və ya peptid matrisanı ionlaşdırır (pillə 1). Elektrik sahəsi nümunədə ionları detektora tərəf sürətləndirir (pillə 2 və 3). İonun detektora çatması üçün zaman kütlə-yük (***m/z)*** nisbətinin kvadrat kökünə proporsionaldır. Eyni yükə malik olan ionlar arasında kiçik ionlar daha sürətlə hərəkət edirlər (detektor üçün zaman qısa olur). Nümunədən hər bir ionun molekulyar çəkisi standartlar üçün olan uçma zamanından istifadı etməklə hesablanır.

Ən çox istifadə olunan iki mass analizator uçuş-zamanı (time-of-flight - TOF) cihazları və ion tutan tələlərdir. TOF cihazlar o faktları istifadə edir ki, detektora çatana qədər ionların analizatorun butun uzunluğunu kəsib keçməsi üçün lazım olan zaman ***m/z***-nin kvadrat kökünə proporsionaldır (kiçik ionlar eyni yükə malik olan böyük ionlara nisbətən daha sürətlə hərəkət edirlər; bax Şəkil 3-43). İon-tutan (tələ) analizatorlarda tənzimlənə bilən elektirik sahəsi ionları tutmaq üçün və ya xüsusi ***m/z***-yə malik olan onları ("tələ ilə") "ovlamaq" üçün və ardıcıl olaraq tutulmuş ionların analizatordan keçərək detektora daxil olması üçün istifadə olunur (bax Şəkil 3-44a). Tədqiqatçılar elektrik sahəsinin dəyişməklə geniş ***m/z*** qiymətinin diapozonuna malik olan ionları, mass spektri yaratmaqla tək-tək öyrənə bilirlər, bu da detektor (***y*** oxu) ilə ölçülən siqnalın intensivliyi ilə təyin olunan nisbi bolluğa qarşı ***m/z*** (***x*** oxu) qrafikidir (Şəkil 3-44b, *yuxarı panel*).

Tandem və ya MS/MS cihazlarında, orjinal mass spektrdə istənilən valideyin ion (Şəkil 3-44b, *yuxarı panel*) sonrakı analizlər üçün seçilə bilər (mass-seçilmə). Seçilmiş ionlar ikinci kameraya keçirilir və orada inert qazla toqquşaraq kizik fraqment ionlara bölünə bilir, sonra alınmış fraqment ionların ***m/z*** və nisbi bolluq qiyməti ikinci MS analizatorda ölçülə bilər (Şəkil 3-44b, *aşağı panel*, həmçinin sonra bu fəsildə Şəkil 3-47 bax). Bu çoxsaylı mass analizlər və fraqmentləşdirmə mərhələləri hamısı bir maşın daxilində, təxminən seçilmiş bir valideyin ion üçün 0.1s müddətində aparıla bilir. Fraqmentləşmə və ardınca gələn mass analizlər qısa peptidlərin (<25 amin turşuları) ardıcıllığının təyin olunmasına imkan verir, çünki toqquşma ilə fraqmentləşmələr ilkin olaraq peptid əlaqələrində əmələ gəlir, belə ki, yaranan çoxsaylı ion fraqmentləri arasında kütlələrindəki fərq fərdi amin turşusunun zəncirdəki kütləsinə uyğun gəlir və verilənlər bazasındakı ardıcıllıq məlumatlarından istifadə edərək ardıcıllığın hesablanmasına imkan verir (Şəkil 3-44b, *aşağı panel*).

Mass spektrometr yüksək həssaslığa malik olub, 1×10^{-16} mol (100 attomol) peptid və ya 1×10^{-15} mol (10 femtamol) zülal kimi kiçik miqdardan 200000 MÇ (MW) qədər aşkar edə bilir. Kütlə ölçülməsinin dəqiqliyində olan səhvlər istifadə olunan spesifik mass analizatordan asılıdır, amma adətən peptidlər üçün təxminən 0.01 faiz və zülallar üçün 0.05 faizdən 0.1 faizə qədərdir. Aşağıda, Bölmə 3.6-da qeyd olunduğu kimi, MS həm zülalların mürəkkəb qatışığının həm də təmizlənmiş zülalın analizində istifadə oluna bilir. MS kimyəvi cəhətdən eyni olan, amma birinin bir və ya daha artıq elementinin ağır stabil (qeyri radioaktiv) izotop (məsələn, ^{2}H, ^{13}C ^{15}N) olduğu digərinin isə yüngül izotop (məsələn, ^{1}H, ^{12}C ^{14}N) olduğu iki peptidi çox asanlıqla fərqləndirə bilir, çünki bu peptidlərin kütləsi fərqlənir. Zülal nümunələr adətən proteazalarla doğranır və doğranmış peptid məhsulları analiz olunur. MS-in xüsusən güclü tətbiq sahələrindən biri, bioloji nümunələrdən zülalların mürəkkəb (kompleks) qatışığını götürmək, onu tripsinlə və ya başqa proteaza ilə doğramaq, maye xromotoqrafiyadan (LC) istifadə edərək komponentləri qismən ayırmaq, və xromotoqrafiya kolonkasından axaraq çıxan məhlulu birbaşa ES tandem mass spektrometrə keçirməkdir. LC-MS/MS adlanan, ən mürəkkəb zülal komplekslərinin analizini demək olar ki, ardıcıl fasiləsiz apara bilən bu metod aşağıda daha ətraflı təhlil ediləcəkdir.

İstənilən verilmiş nümunədə mass spektrometr ilə təyin olunmuş ionların bolluğu mütləq deyil, nisbi qiymətə malikdir. Ona görə də, iki müxtəlif nümunədə (məsələn normal orqanizmə qarşı mutantda) xüsusi zülalların miqdarını müqayisə etmək üçün MS-dən istifadə edən hər bir kəs, nümunələrdə daxili standartlara malik olmalıdır, yəni standartların miqdarı iki nümunədə fərqlənməməlidir. Sonra hər bir nümunədə olan standartların nisbətinə əsasən maraq daxilində olan zülalın miqdarını hesablamaq olur.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 3-44 Zülalların və peptidlərin molekul kütləsi elektro-çiləmə ionlaşma ion-tutan mass spektrometriyası ilə təyin oluna bilər. (a) Elektro-çiləmə (ES) ilə ionlaşma, məhlulu yüksək elektrik gərginlikli iynədən keçirərək çiləməklə (çox kiçik damcılar yaratmaqla) zülal və peptidləri yüksək dərəcədə yüklənmiş qazşəkilli ionlara çevirir (damcıları yükləməklə). Məhlulun buxarlanması qazşəkilli ionları əmələ gətirir ki, bunlar da mass spektrometrə daxil olur. İonlar ion-tələsi mass-analizatorla analiz olunur və sonra detektora tərəf yönəldilir. (b) *Yuxarı panel*: Siçanın I sinif H-2 histouyğunluq antigenin Q10 α zəncirindən üç böyük və bir neçə xırda peptidin qatışığının mass spektri detektora çırpılan ionların nisbi çoxluğu (*y* oxu) kütlədən-yükə (m/z) nisbətinin funksiyası (*x* absis oxu) kimi təsvir edilmişdir. *Aşağı panel*: (a) hissəsində göstərilən ion-tələsi kimi MS/MS cihazında peptid ion xüsusi kiçik ionlara fraqmentasiya olunmaq üçün seçilə və sonra da analiz oluna bilir. MS/MS spektr (həmçinin ion spektr-məhsulu kimi də adlandırılır) valideyin ionlar barədə dəqiq quruluş məlumatını, o cümlədən peptidlər üçün ardıcıllıq məlumatını verir. Burada, ***m/z***-si 836.47 olan ion seçilib fraqmentləşdirilmişdir və alınan ionların ***m/z*** mass spektri ölçülmüşdür. Qeyd etmək lazımdır ki, ***m/z***-si 836.47-dən uzun olan ion yoxdur, çünki ionlar farqmentləşdirilmişdir. Məhsul ionlarının müxtəlif ölçülərindən, belə eksperimentlərdə peptid əlaqələrin tez-tez qırılmasınıdan, fərdi amin turşusu fraqmentlərinin məlum olan ***m/z*** qiymətindn və verilənlər bazası məlumatından, peptidin ardıcıllığı, FIIVGYVDDTQFVR kimi alına bilər. [(b) hissəsi S.Carr çap olunmamış məlumatlarındandır.]

İstənilən verilmiş nümunədə mass spektrometr ilə təyin olunmuş ionların bolluğu mütləq deyil, nisbi qiymətə malikdir. Ona görə də, iki müxtəlif nümunədə (məsələn normal orqanizmə qarşı mutantda) xüsusi zülalların miqdarını müqayisə etmək üçün MS-dən istifadə edən hər bir kəs, nümunələrdə daxili standartlara malik olmalıdır, yəni standartların miqdarı iki nümunədə fərqlənməməlidir. Sonra hər bir nümunədə olan standartların nisbətinə əsasən maraq daxilində olan zülalın miqdarını hesablamaq olur. Bu yanaşma zülal səviyyəsində nümunələrarası müqayisəni kmiyyət (miqdari) cəhətdən dəqiq aparmağa imkan verir. Alternativ yanaşmada, iki müxtəlif hüceyrə və ya toxuma nümunələrinin bir yerə qarışdırılmış zülallarının miqdarının eyni zamanda müqayisəsi aparılır. Belə qarışdırılmış yanaşma, nümunələrdən birində zülalın başqa nümunənin zülalına nisbətən fərqli stabil izotoplara malik olması təmin edildikdə mümklün olur. İki nümunəninm kimyəvi cəhətdən identik olan peptidlərinin kütləsi fərqli olacaq (yüngülə qarşı ağır) ona görə də, MS tərəfindən fərqləndiriləcək. Analiz olunan hüceyrələrdən ayrılmış belə zülallara ağır və ya yüngül izotopların kimyəvi və ya fermentativ yolla daxil edilməsi üçün bir sıra metodlardan istifadə etmək olur. Alternativ olaraq hüceyrələr və ya orqanizmlər əvvəlcə "ağır" və ya "yüngül" izotop atomlara malik olan amin turşuları olan mühitdə yetişdirilir, bu zaman həmin amin turşuları biosintez yolu ilə bü nümunədə olan bütün zülallara daxil olurlar. Hüceyrələrdə olan bütün zülalların tamamilə nişanlanmış olmasına əmin olmaq üçün adətən hüceyrələr beş və ya daha artıq hüceyrə tsikli "ağır" və ya "yüngül" izotop atomu olan amin turşuları ilə inkubasiya edilirlər. Sonra, bu iki nümunədən olan zülallar bir yerə qatılır, proteazalarla peptidlərə doğranır və alınan peptidlər mass spektrometrdə analiz olunur. "Ağır" nümunədən ayrılmış zülal və peptidlər mass spektrometrdə onların ağır yükünə görə digər, "yüngül" nümunədən alınan zülallardan fərqləndirilə bilir. Beləliklə, hər bir nümunədə hər bir zülalın nisbi miqdarının birbaşa müqayisəsi, məsələn şiş hüceyrələrində normal hüceyrələrə qarşı və ya dərmanla işlənilmiş və işlənilməmiş hüceyrələrdə aparıla bilər. Nümunələr laboratoriyada yetişdirilmiş kultura hüceyrələri olduqda bu metod ***hüceyrə kulturasında amin turşularının stabil izotopla nişanlanması*** adlanır (**SILAC**).

Zülalların İlkin Quruluşu Kimyəvi Metodla və Genin Ardıcıllığına Əsasən Təyin Oluna Bilər

Zülalların aminturşu ardıcıllığının təyin olunmasının klassik metodu zülalın Edman parçalanmasıdır. Bu prosesdə N-sonluqlu amin turşusunun sərbəst amin qrupu polipeptiddə nişanlanır və sonra nişanlanmış amin turşusu polipeptiddən kəsilərək ayrılır və yüksək-təzyiqli xromotoqrafiya yolu lə təyin olunur. Polipeptid bir qalıq qısalır və N-sonluqda artıq yeni amin yutrşusu olur. Bu tsikl polipeptid tam qısalaraq sonuncu amin turşusu identifikasiya olana qədər təkrar olunur.

Təxminən 1985-ci ilə qədər bioloqlar zülalın ardıcıllığını təyin etmək üçün, çox istifadə olunan Edmon kimyəvi metodunu istifadə edirdilər. Amma, indi zülalın tam ardıcıllığının təyini adətən genom ardıcıllığının və məlumat RNT ardıcıllığının oxunması ilə həyata keçirirlir. Çox orqanizmlərin tam genom ardıcıllığı artıq oxunmuşdur və insanın və bir sıra model orqanizmlərin genom ardıcıllığının verilənlər bazası sürətlə genişlənməkdədir. Fəsil 6-da müzakirə olunduğu kimi, zülalların a.t. ardıcıllığı zülalları kodlaşdıran guman olunan DNT ardıcıllığından alına bilər.

Ayrılmış zülalların ilkin quruluşunu təyin etmək üçün çox güclü yanaşma MS-in və ardıcıllıq üzrə verilanlər bazasının kombinasiyasıdır. Əvvəlcə, MS yolu ilə zülalların peptid "mass finqerprint"i alınır. ***Peptid mass finqerprint*** zülalların tripsin kimi spesifik proteazalarla doğranması yolu ilə əmələ gəlmiş peptidlərin molekul çəkilərinin siyahısıdır. Valideyin zülalın molekul çəkisi və onun proteolitik fraqmentlərinin çəkisi, sonra genom verilənlər bazasını, eyni və ya oxşar mass-fingerprintə malik olan, istənilən oxşar-ölçülü zülalı axtarmaq üçün istifadə olunur. Yuxarıda təsvir olunduğu kimi, mass spektrometr MS/MS-i tətbiq etməklə, peptidlərin birbaşa a.t. ardıcıllığını oxumaq üçün istifadə oluna bilir.

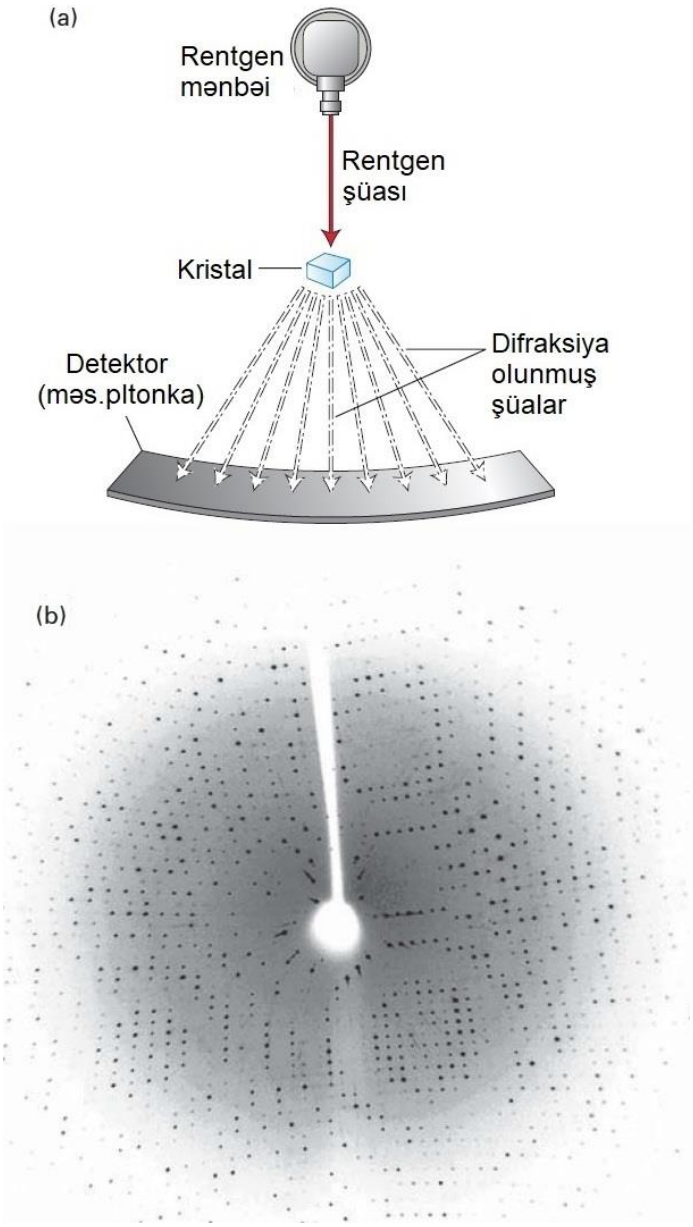
Zülalların Konformasiyası Daha Mükəmməl Fiziki Metodlarla Təyin Edilir

Bu fəsildə biz göstərmişdik ki, zülalın funksiyası zülalın quruluşundan asılıdır. Beləliklə zülalın necə işlədiyini anlamaq üçün onun üç-ölçülü quruluşu təyin olunmalıdır. Zülalın konformasiyasının təyin olunması inkişaf etmiş fiziki metodların tətbiqini və alınmış eksperimental nəticələrin kompleks analizini tələb edir. Biz burada, zülalların üç-ölçülü modelini yaratmaq üçün istifadə olunan üç metodu qısaca təsvir edirik.

Rentgen Kristalloqrafiyası Rentgen kristalloqrafiyası ilə zülalların üç-ölçülü quruluşunu təyin etmək üçün ilk pioner iş Maks Preutz və Con Kendrev tərəfindən 1950-ciildə aparılmışdır. Bu metodda, rentgen şüaları kristal quruluşda millionlarla zülal molekullarının bir-birinin uzərində möhkəm şəkildə düzlənmiş olduğu zülal kristalını kəsib keçir. Rentgen şüalarının dalğa uzunluğu təxminən 0.1-0.2 nm-dir, bu kifayət qədər qısadır və zülalda fərdi atomların mövqeyini təyin etməyə imkan verir. Kristal atomlarında elektronlar rentgen şüalarını dağıdır (səpir) və fotoqrafiya filmləri və ya elektron detektorla qarşısını kəsdikdə onlarda diskret ləkələrin difraksiya modelini (formasını) yaradır (Şəkil 3-45).

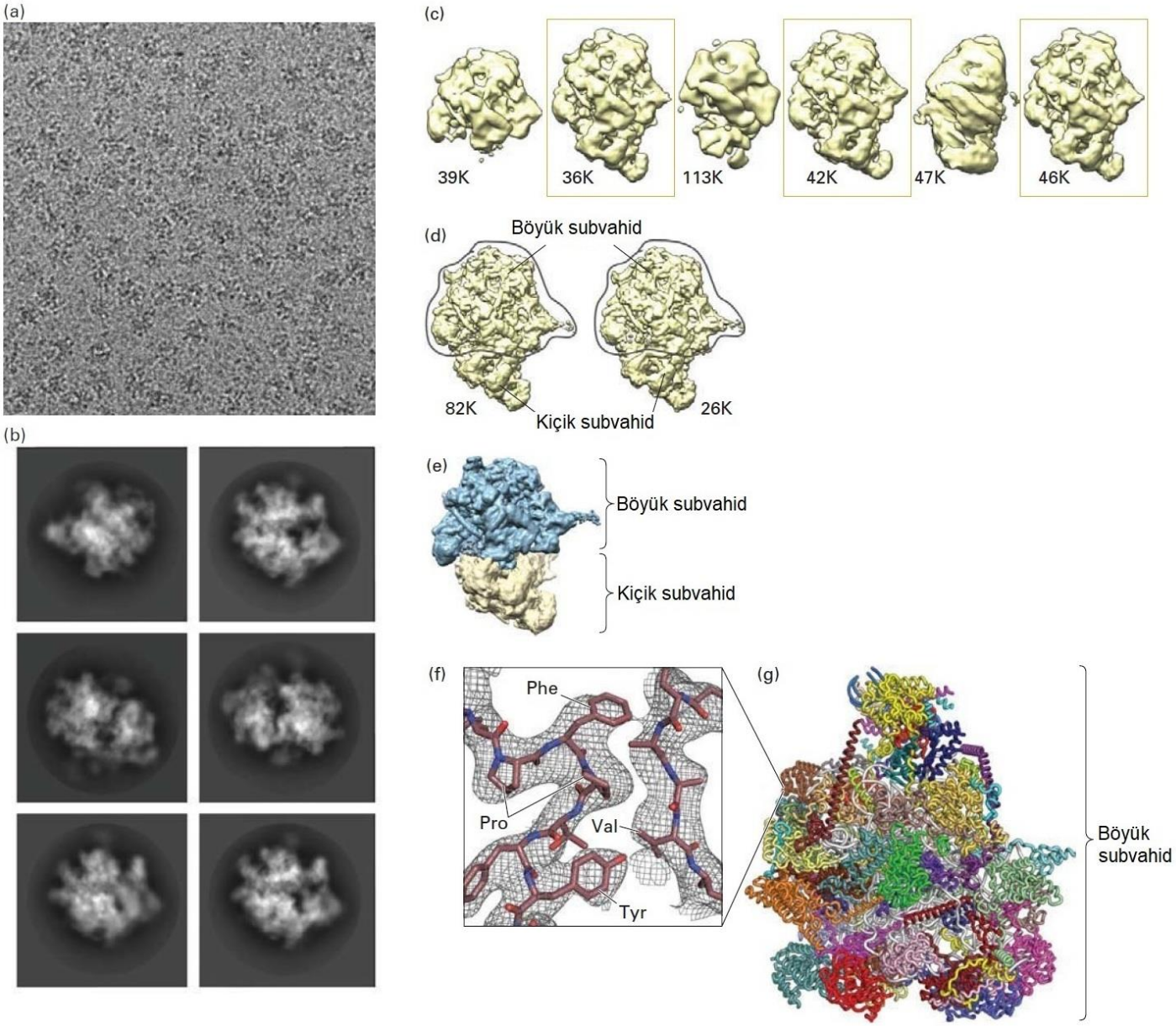
Bu cürə difraksiya modeli son dərəcə mürəkkəb olub, ölçülmüş intensivlikləri elektronların paylanmasından asılı olaraq dəyişilən, 25000 qədər çox miqdarda difraksiya ləkələrindən və ya refleksiyalardan təşkil olunur və öz növbəsində, elektronların paylanması zülalların atom quruluşu və üç-ölçülü konformasiyası ilə müəyyən olunur. Diffraklsiya modelinin interpretasiyası və elektronların paylanmasının hesablanması üçün zülalların (ağır metalların birləşməsi kimi) mürəkkəb hesablamaları və modifikasiyaları edilməlidir (bu ***elektron sıxlığı xəritəsi*** adflanır). Elektron sıxlığı xəritəsinin bir hissəsini Şəkil 2-9-da görmək olar. Üç-ölçülü elelektron sıxlığı xəritəsini əldə etməklə, zülalın elektron sıxlığına uyğun olan molekulyar modelini "qurmaq" olur, oxucu bu kitab boyu onu diaqramlarda görür (məsələn, Şəkil 3-9). Bu proses, daşı gölməçəyə atan zaman əmələ gələn xırda müntəzəm dalğaların əməl gətirdiyi nizamlı dəqiq formaya bənzəyir. Hərçənd ki, bəzən zülalların bir hissəsinin quruluşunu rentgen-kristalloqrafiyasından istifadə etməklə təmiz müəyyən etmək olmur, amma tədqiqatçılar zülalların çoxunun tipik nümayəndələrinin quruluşunu müntəzəm şəkildə təyin edirlər. Hal hazırda rentgen-kristalloqrafiya yolu ilə 90000 çox zülalın

dəqiq üç-ölçülü quruluşu, o cümlədən 35000-dən çox müxtəlif zülalın ardıcıllığı təyin edilmişdir. Bu quruluşların hər birini onların "PDB" qeydi daxil olmaqla Quruluş Bioinformatika Zülal Məlumat Bankı Tədqiqat Laboratoriyasında (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank) tapmaq olar (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do).



Krioelektron Mikroskopiya Bəzi zülallar asanlıqla kristallaşsalar da, digərlərinin, xüsusən də böyük çoxsubvahidli zülalların və membranla-birləşmiş zülalların kristalının alınması, çox hallrda uyğun şəraitləri tapmaq üçün vaxt aparan, ümumiyyətlə əgər onları tapmaq mükün olursa, robotların kömək etdiyi sınaq-və-səhvlərdən ibarət olan cəhdlər bəzən həddən artıq uzun zaman tələb edir. (Quruluş tədqiqatlarını aparmaq üçün yararlı olan kristal ölçüsünün böyüdülməsi elmi olduğu qədər də bir incəsənətdir.) Bu cürə çətin-kiristallaşan zülalların quruluşunun təyin olunması üçün bir neçə yol vardır. Onlardan biri krioelektron mikroskopiyadır (Şəkil 3-46). Bu metodda, quruluşun qorunub saxlanması üçün zülal nümunəsinin su məhlulu tez şəkildə elektron mikroskopun nümunə tutqacında nazik təbəqəyə keçirilərək kəskin şəkildə maye heliumda dondurulur. Sonra o donmuş şəkildə, krioelektron mikroskopunda hidrasiya olunmuş vəziyyətdə öyrənilir. Zülalın təsvirləri müxtəlif bucaqlar altında, quruluşunda radiasiya ilə induksiya olunan zədələnməyə mane olmaq üçün aşağı dozalı elektrondan istifadə edərək çox həssas kamera ilə çəkilir və film (pleyonka) üzərində yazılır. Hər bir fərdi zülal donmuş nümunədə fərqli orientasiyalara malik olduğundan güclü kompüter proqramları vasitəsi ilə bu təsvirlər analiz olunaraq eyni orientasiyalı qruplarda çeşidlənirlər. Hər bir orientasiyanın orta təsviri qrupdakı yüzlərlə və ya minlərlə müxtəlif molekulların təsvirlərindən hesablanır və sonra kompüter hər biri zülalın müxtəlif orientasiyadan görünüşünü göstərən orta təsvirlərini toplayır və zülalların üç-ölçülü quruluşunu qurur. Bu texnologiyadakı son inkişaflar polipeptid özülün və aminturşu yan zəncirlərinin fərqlənə biləcəyi quruluşları yaradır. Bu quruluşlar tədqiqatçılara imkan verir ki, zülalların necə funksiya göstərmələirini izah etməyə imkan verən molekulyar modelləri yaratsınlar. Hüceyrə quruluşunun vizuallaşdırılmasında krioelektron mikroskopiyanın və başqa tipli elektron mikroskopiyaların istifadə edilməsi Fəsil 4-də müzakirə olunur.

EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 3-45 Rentgen-kristalloqrafiya, zülalın üç ölçülü quruluşunu təyin edən diffraksiya məlumatlarını təmin edir. (a) Rentgen-kristalloqrafiya ilə təyin etmənin əsas komponentləri. Rentgenin dar şüaları kristala tuşlananda onun bir hissəsi kristalı birbaşa kəsib keçir, qalanları isə müxtəlif istiqamətlərdə dağılır (difraksiya edir). Difraksiya ləkələrinin dövri yerdəyişmələrini əmələ gətirən difraksiya etmiş dalğaların intensivliyi rentgen plyonkaları (filmləri) üzərində və ya bərk-vəziyyətdə olan elektron detektora yazılır. (b) Bərk-vəziyyətdə olan elektron detektorda toplanmış zülal kristalının rentgen-difraksiya profili. Bunlara bənzər ləkələrin profilinin kompleks analizindən zülalda atomların yerləşməsi təyin edilə bilər. Bax J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, and L. Stryer, 2015, *Biochemistry*, 8th ed., Macmillan. [(b) hissəsi nəzakətlə James M. Berger tərəfindən.]



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 3-46 Krioelektron mikroskopiyada insanın mitoxondrial ribosomunun quruluşunun analizi. Mitoxondri mürəkkəb (kompleks) çoxfunksiyalı hüceyrıdaxili orqanoid olub enerji daşıyıcısı ATP-ni sintez etməsi ilə çox məşhurdur (bax Fəsil 12). İnsanın mitoxondrisi mitoxondrial ribosomlar adlandırılan böyük (1.7 MDa), çoxzülallı (ən azı 78) və çox-RNT-li kompleksdən istifadə edərək mitoxondrial DNT ilə kodlaşdırılan zülalları sintez edə bilir. (a) İnsanın ayrılmış mitoxondrial ribosomlarının krioelektron mikrofotosu. Ribosomlarla bufer məhlulu arasında aşağı kontrast təsvirdə təsadüfi yönəlmiş fərdi donmuş ribosom hissəciklərini aydın görməyə çətinlik törədir. (b) 323292 fərdi zərrəciyinn təsvirinin avtomatik prosessinqi onların orientasiyalarına əsaslanan siniflərdə qruplaşmasına, hər bir sinifdə təsvirlərin ortalama çıxarılmasına və ribosomun aydın təsvirinin yaradılmasına imkan verir. (c) Əlavə komputer analizləri fərqli quruluşları yaradır, bunların hər biri on minlərlə fərdi şəkillərə əsaslanır (hər bir quruluş üçün analiz olunan hissəciklərin minlərlə [K] sayı hər birinin altında gtöstərilir). Bokslara alınmış quruluşlar əlavə analizlər üçün seçilmişdir və hər biri (d)-də göstərilən, identik iki böyük virtual subvahiddən ibarət olan iki çox oxşar modeli yaratmışdır. (e) Böyük (mavi) və kiçik (sarı) subvahidlərin elektron sıxlığının rənglə-kodlaşdırılan aşağı rezolyusiyalı modeli. Kiçik subvahidin konformasiya heterogenliyi onun yüksək-rezolyusiyalı quruluşunun burda göstərilmiş verilənlərdən təyin olunmasına mane olmuşdur. (f) Böyük subvahiddə olan zülalların birinin hissəsinin eksperimental təyin olunmuş elektron sıxlığının (tor quruluş) yüksək-böyüdülmüş görünüşü elektron sıxlığının polipeptid zəncirlərin superyığılmış molekulyar modelinin qurulmasında necə istifadə edildiyini işıqlandırır. Böyük subvahid daxilində olan zülalın bu çox kiçik hissəsində prolin (Pro), fenilalanin (Phe), valin (Val) və tirozin (Tyr) qalıqlarının yan zəncirləri asanlıqla görünür və zülalların çox yüksək rezolyusiyalı quruluşunun təyin edilməsində krioelektron mikroskopunun gücünü nümayiş etdirir. (g) Böyük subvahiddə 48 zülal subvahidinin (müxtəlif rənglər) modeli 3.4 Å rezalyusiyada təyin edilmişdir. [American Association for the Advancement of Science, razılığı ilə Brown, A., et al, "Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria." *Science*, 2014, **346** (6210): 718-722-dən yen idən çap olunur, razılıq Copyright Clearance Center, Inc. vasitəsilə alınmışdır.]

NMR spektraskopiya 200 qədər amin turşusu qalığından ibarət olan kiçik zülalların üç-ölçülü quruluşları müntəzəm olaraq nüvə maqnit rezonansı (NMR) spektroskopiya metodu ilə öyrənilə bilir və xüsusi metodlardan istifadə etməklə tədqiq olunan zülalların ölçü sırasını daha böyük zülallara tərəf genişləndirmək olur. Bu metodda qatılaşdırılmış zülal məhlulu maqnit sahəsinə yerləşdirilir və müxtəlif atomlarda nüvə spin vəziyyətinə müxtəlif radio tezliklərin təsiri ölçülür. İstənilən atomun spin vəziyyətinə yaxındakı (bitişik) amin turşusunda olan qonşu atoimlar təsir edir və daha yaxınlıqda olan qalıqlar uzaqdakı qalıqlara nisbətən daha güclü təsirə malik olurlar. Təsirin qiymətindən qalıqlar arasındakı məsafə üçbucağa-bənzər (triangulation-like) proseslə hesablana bilər, bu məsafələr sonra zülalın üç-ölçülü quruluş modelini yaratmaq üçün istifadə edilir. Rentgen kristalloqrafiya ilə NMR spektroskopiya arasında əhəmiyyətli fərq odur ki, birinci metod birbaşa atomların yerləşməsini təyin etdiyi halda ikinci metod birbaşa atomlar arasındakı məsafəni təyin edir, bundan da quruluş hesablanır.

Baxmayaraq ki, NMR zülalların kristallaşmasını tələb etmir, bu onun müəyyən üstünlüyüdür, amma bu metodun imkanları 50 kDa molekul çəkiyə qədər malik olan zülalların ölçüsündə məhdudlaşır (hərçənd ki, yeni texnologiya daha böyük molekulların dinamikasını ölçməyə imkan verir). Amma, NMR analizləri zülalların bir sıra çox yaxın olan, amma eyni olmayan konfarmasiyalarını almaq və bu konformasiyalar arasında birindən digərinə keçmək (zülal dinamikası) qabliyyətinə malik olmaları barədə informasiyanı təmin edə bilir. Bu, tamamilə möhkəm quruluşu olmayan, amma "nəfəs ala bilən" və ya tərkibindəki atomların nisbi mövqelərində kiçik dəyişikliklər göstərə bilən zülalların ümumi bir xüsusiyyətidir. Bəzi hallarda bu variasiyalar funksional əhəmiyyət kəcb edir, məsələn, zülalların bir-biri ilə necə birləşməsinə təsir edə bilirlər. NMR quruluş analizləri xüsusən ayrılmış zülal domenlərinin öyrənilməsində çox əhəmiyyətlidir, bu domenlər çox hallarda stabil quruluş şəkilində alınır və bu metodla tədqiq olunmaq üçün kifayət qədər kiçik ölçüyə malik olurlar. Bu gün artıq Zülal Verilənlər Bankında, quruluşu NMR ilə təyin olunan 10000-dən artıq zülal məlumdur.

Zülal dinamikasının və zülal-zülal qarşılıqlı əlaqələrinin öyrənilməsi üçün başqa bir güclü metod hidrogen/deyterium mübadiləsi mass spektrometriyadır (HXMS). Zülal deyteriumlu su (D_2O) məhluluna yerləşdiriliəndə deyteriumun peptid əlaqələrindəki amidlərdə olan hidrogenlə mübadiləsi sürəti amidin məhlulda əldəolunma qabliyyətindən asılıdır. Zülalın səthində olan amidlər daha çox əldəolunandırlar və sürətlə hidrogen/deyterium mübadiləsinə uğrayırlar. Zülalın mərkəzində batıb qalmış amidlər və ya zülal-zülal araüzündə (interfeysində) qalmış amidlər, eləcə də zülalın başqa hissələri ilə hidrogen əlaqəsində iştirak edən amidlər zəif hidrogen/deyterium mübadiləsini nümayiş etdirirlər. Zülalın konformasiyasındakı dəyişiklik və ya onun başqa molekullarla birləşməsi onda bir və ya daha artıq amidin hidrogen/deyterium mübadiləsi sürətini dəyişmək potensialına malikdir. MS analizlər belə konformasiya dəyişmələrinin hiperhəssas sınağına imkan verir, zülalın başqa molekullarla birbaşa əlaqədə olan və ya belə konformasiya dəyişikliyinə uğrayan bu hissələrinin identifikasiyasını mümkün edir.

3.5 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSIYALARI

Zülalların Təmizlənməsi, Aşkarlanması və Xarakterizə olunması

- Zülalları başqa hüceyrə komponentlərindən və bir-birindən onların fiziki və kimyəvi xassələrindəki fərqlərinə görə ayırmaq olur.
- Sentrifuqalama zülalları, onların kütləsinin və formasının təsir etdiyi sedimentasiya dərəcəsinə görə ayırır (çax Şəkil 3-37).
- Elektroforez zülalları onların tətbiq edilən elektrik sahəsində hərəkət etmə sürətinə görə ayırır. SDS-poliakrilamid gel elektroforezi (SDS-PAGE) molekulyar çəkisinə görə 10 faiz və daha az fərqlənən polipeptid zəncirləri bir-birindən ayıra bilir (bx Şəkil 3-38). İki-ölçülü gel elektroforez zülalları əvvəlcə yükünə görə (birinci ölçü) və sonra kütləsinə görə (ikinci ölçü) ayıraraq daha əlavə imkanları təmin edir.
- Maye xromotoqrafiya zülalları onların sferik qranulalarla doldurulmuş kolonkalardan hərəkət edərək keçmək sürətinə əsasən ayırır. Kütlələrinə görə fərqlənən zülallar gel filtrasiya kolonkalarında ayrılırlar; yüklərinə görə fərqlənən zülallar ion-mübadiləsi kolonkalarında ayrılırlar; liqand birləşdirmə xassələrinə görə fərqlənən zülallar isə affin kolonkalarında ayrılırlar (bax Şəkil 3-40).
- Zülalların aşkar olunması və miqdarının təyin olunması üçün müxtəlif test sınaqlardan istifadə olunur. Bəzi sınaqlar, asanlıqla tutula bilən siqnalları yaratmaq üçün işıq-saçan reaksiyalara əsaslanır. Başqa sınaqlar fermentlərlə və ya xromogen substratlarla əmələ gələn amplifikasiya olunmuş rəngli siqnalları verirlər.
- Anticismlər zülalların aşkar olunmasında, ayrılmasında və kəmiyyət (miqdari) analizində istifadə olunan çox güclü reagentdir.
- Vesterin blottinq adlandırılan immunoblottinq, anticismlərlə zülalların aşkar olunmasında yüksək spesifiklik və həssaslıq göstərən və yüksək-imkanlı SDS-PAGE ilə ayrılan xüsusi zülalların öyrənilməsində tez-etz istifadə olunan metoddur (bax Şəkil 3-41).
- Çox zaman IP kimi qısaldılan immunçökdürmə maraq zülalını bu zülala spesifik olan anticismlərdən istifadə etməklə zülalların mürəkkəb qatışığında başqa zülallardan ayırmağa imkan verir. Bu anticismlər onların hədəf zülallarının sonrakı analizlər üçün çökdürülməsində istifadə olunurlar. Hədəf zülala sıx birləşmiş molekullar onunla birlikdə çökdürülə bilirlər (immun-çökdürmə adlanır).
- Həm radioaktiv həm də "ağır" və "yüngül" qeyri rtadioaktiv isotoplar zülalların və başqa biomolekulların öyrənilməsində əhəmiyyətli rol oynayırlar. Onlar molekulun kimyəvi tərkibini dəyişmədən ona daxil olurlar, və ya ona yarlıq kimi birləşirlər. Onlar, zülalların sintezinin, lokalizasiyasının, prosessinqinin və stabilliyinin öyrənilməsində istifadə oluna bilirlər.
- Avtoradioqrafiya, iki-ölçülü elektroforezdən (fotoqrafiya emulsiyası və ya elektron detektordan) istifadə edərək hüceyrədə, toxumada və ya elektroforetik geldə radioaktiv nişanlanmış molekulların aşkar olunamsında istifadə olunan metoddur

- Puls-izləmə nişanlanması, zülalların və başqa metabolitlərin hüceyrədaxili taleyini aşkar etməyə imkan verir (bax ,əkil 3-42).
- Mass spektrometriya, zülalların və peptidlərin aşkar olunmasında, identifikasiyasında və xarakterizə olunmasında istifadə olunan çox həssas və yüksək dəqiqliyə malik olan metoddur
- Zülalların üç-ölçülü quruluşu, rentgen-kristalloqrafiya, krioelektron mikroskopiya, və NMR spektroskopiya yolları ilə aşkar olunur. Rentgen-kristalloqrafiya ən dəqiq quruluşu almağa imkan verir amma o, zülalın kristallaşmasını tələb edir. Krioelektrin mikroskopiya, kristallaşması çətin alınan böyük zülal komplekslərinin öyrənilməsi üçün ən dəqiq metoddur. Yalnız nisbətən kiçik zülallar NMR-da üç-ölçülü quruluş analizi oluna bilir.

3.6 Proteomiks

İyirminci əsirdə zülalların öyrənilməsi əsasən fərdi zülalların analizi ilə məhdudlaşmışdır. Məsələn, hər hansı tədqiqatçı fermenti onun fermentativ fəallığını (onun substratlarını, məhsullarını, reaksiyanın sürətini, kofaktor tələblərini, pH və sairi), onun quruluşunu, təsir mexanizmini təyin etməklə öyrənmək istəmişdir. Bəzi hallarda, metabolik yolda iştirak edən bir neçə ferment arasında qarşılıqlı əlaqə də öyrənilə bilirdi. Geniş miqyasda, fermentin yerləşməsi (lokalizasiyası) və fəallığı hüceyrə və ya toxuma kontekstində öyrənilməlidir. Fermentin ekspressiyasına və fəallığına mutasiyanın, xəstəliklərin, və dərmanların təsiri də həmçinin tədqiqat mövzüsüna çevrilə bilər. Bu cürə çoxtərəfli yanaşma fərdi zülalların və ya nisbətən az sayda qarşılıqlı əlaqədə olan zülalların funksiyasının və təsir mexanizminin dərinliklərinə girməyə imkan yaradır. Amma, zülalların öyrənilməsinə bu cürə tək-tək yanaşma hüceyrədə, toxumada və verilmiş orqanizmdə proteomada nə baş verilməsi haqqında geniş qlobal məlumatı təmin etmir.

Proteomiks Zülalların Hamısının və ya Əksər Çoxluğunun Bioloji Sistemlərdə Tədqiqidir

Genomiksin (genom DNT-nin ardıcıllığının oxunması, və onunla bağlı olan texnologiyalar, o cümlədən hüceyrələrdə və toxumalarda mRNT-lərin bütün səviyyələrinin eyni zamanda analizi) meydana gəlməsi açıq şəkildə göstərdi ki, biologiyada qlobal və ya sistemli şəkildə yanaşma unikal və yüksək dərəcədə qiymətli anlayışları təmin edir. Bir çox alimlər anladılar ki, bioloji sistemlərdə zülalların qlobal (geniş) analizi bizim anlayışlarımız üçün dəyərli töhfələr verən potensiala malikdir. Beləliklə yeni bir sahə - **proteomiks** doğuldu. Proteomiks, bütün zülalların və ya onların çoxluğunun miqdarının, modifikasiyalarının, qarşılıqlı təsirlərinin, yerləşmələrinin (lokalizasiyalarının), funksiyalarının bütün-orqanizmdə, toxumada, hüceyrə və ya hüceyrə-daxili səviyyədə sistematik tədqiqatdır.

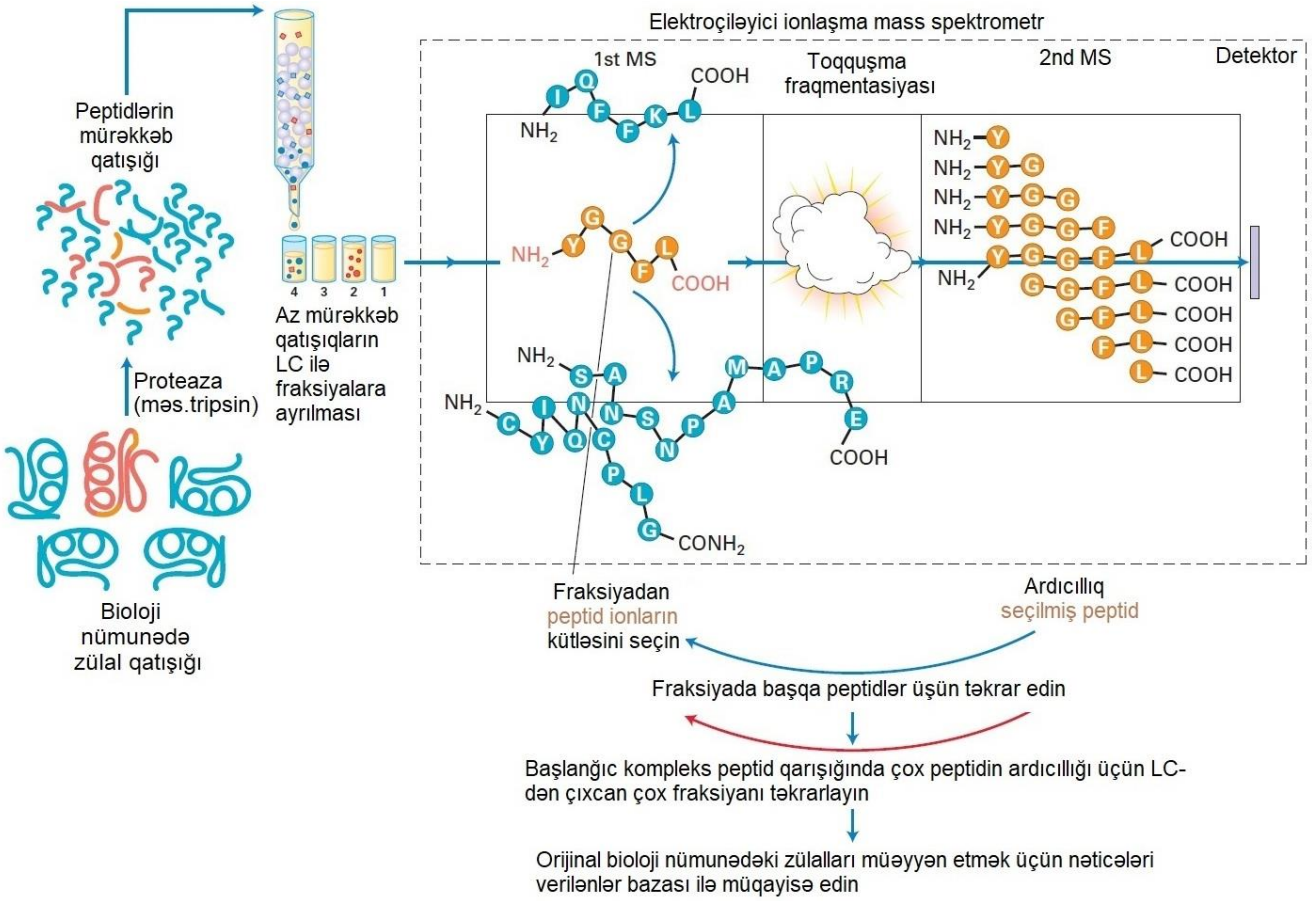
Bir sıra geniş mənalı suallar proteomo tədqiqatlarına müraciət olunmuşdur:

- Verilmiş nümunədə (bütov orqanizm, toxuma, hüceyrə və ya hüceyrədaxili orqanoid) bütün proteomanın hansı fraksiyası ekspressiya olunub (başqa sözlə, hansı zülallar mövcuddur)?
- Nümunədə mövcud olan bu zülallarda onların nisbi zənginliyi (yayılması) necədir?
- Zülalların müxtəlif splays formalarının və kimyəvi modifikasiy olunmuş formalarının (fosforlaşmış, metilləşmiş, yağ turşusu asilləşmiş) nisbi miqdarı necədir?
- Böyük çoxzülzllı komplekslərdə hansı zülallar mövcuddur və hansı zülal hər bir kompleksdə iştirak edir? Bu komplekslərin funksiyaları nədir və onlar necə qarşılıqlı təsirdə olurlar?
- Hüceyrənin vəziyyəti (məsələn, böyümə sürəti, hüceyrə tsiklinin mərhələsi, differensasiya, stress səviyyəsi) dəyişilərkən, hüceyə daxilindəki zülallar və ya hüceyrədən ifraz olunmuş zülallar xarakterik (finqəprintinqə-bənzər) qaydada dəyişilirmi? Hansı zülallar dəyişir və necə (nisbi miqdarı, modifikasiyaları, splays formaları və sair) dəyişir? [Bu suallara cavab verilməsi, Fəsil 9-da müzakirə olunan ***transkripsiya profilinqini*** (***mRNT***) tamamlayan ***zülal ekspressiyası profilinqi*** formasını tələb edir.]
- Bu cürə finqəprintinqə-bənzər dəyişmələr diaqnoz məqsədi üçün istifadə oluna bilərmi? Məsələn, müəyyən xərçəng və ya ürək xəstəlikləri qan zülallarında xarakterik dəyişilmələri əmələ gətirirmi? Proteomik finqəprint əmələ gəlmiş xərçəng xəstəliyinin xüsusi kimyəvi-müalicə dərmanlarına qarşı dözümlü və ya həssas olmasını təyin etməyə kömək edirmi? [Proteomik finqəprint həmçinin, vəziyyətin dəyişilməsinə səbəb olan mexanizmlərin öyrənilməsi üçün başlanğıc nöqtəsi ola bilər. Xüsusi vəziyyət üçün diaqnostik olan dəyişiklikləri göstərən zülallar (və başqa biomolekullar) ***biomarkerlər*** adlandırılır.]
- Proteomada olan dəyişikliklər dərman üçün hədəfləri tapmağa kömək edirmi, yaxud dərmanın toksik yan təsirlərini induksiya edə bilən mexanizmləri təklif edirmi? (Əgər belədirsə, o zaman, dərmanın çox az yan təsirə malik olan modifikasiya olunmuş formasını yaratmaq mümkün ola bilər.)

Bunlar proteomiksin istifadəsinə ünvanlana bilən sualların yalnız kiçik bir hissəsidir. Bu suallara cavab vermək üçün istifadə olunan metodlar sualların özləri qədər də geniş müxtəlifliyə maılikdirlər və onların sayı getdikcə sürətlə artır.

Mass Spektrometriyanın Qabaqcıl Metodları Proteomik Analizləri Üçün Kritik Əhəmiyyətlidir

Qabaqcıl proteome texnologiyası (məsələn, mass spektrometriya) praktiki öyrənilməkdə olan sualların tiplərinə geniş təsir edə bilər. Uzun illər, iki-ölçülü gel elektroforez tədqiqatçılara zülalların kompleks qatışığını ayırıb göstərməyə və xarakterizə etməyə imkan yaratdı (bax Şəkil 3-39). İki-ölçülü geldə olan ləkələr kəsilib götürülməli, zülal proteolizlə (məsələn trpsinlə doğramaqla) fraqmentlərə ayrılmalı və alınan fraqmentlər MS ilə təyin olunmalıdırlar. İki-ölçülü gel metoduna alternativ olan ***yüksək-ötürücülü LC-MS/MS*** metodudur. Şəkil 3-47, əsas LC-MS/MS yanaşmasını göstərir, burada zülalların kompleks qatışığı proteazalarla doğranır, nəticədə alınan saysız-hesabsız peptidlər LC ilə müxtəlif çoxsaylı, daha kiçik komplekslərdən ibarət olan fraksiyalara ayrılır və yavaş-yavaş, amma fasiləsiz olaraq elektrik-çiləmə ionlaşma ilə tandem mass



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 3-47 LC-MS/MS kompleks bioloji nümunələrdə zülalların aşkar olunmasında istifadə olunur. Bioloji nümunələrdə zülalların mürəkkəb qatışığı (məsələn Qolci orqanoidin ayrılmış preparatı) proteazalarla doğranır, əmələ gəlmiş peptidlərin qatışığı maye xromotoqrafiya (LC) ilə çoxsaylı kiçik komplekslərə, fraksiyalara ayrılır, sonra da tədricən (asta-asta), amma fasiləsiz şəkildə elektroçiləmə ionlaşma ilə tandem mass spektrometrə çilənir. Sonra nümunələr ardıcıl şəkildə, peptidlərin çoxunun kütlələri və ardıcıllıqları təyin olunana qədər MS/MS-in çox tsiklli təsirinə məruz qoyulur və alınan nəticələr verilənlər bazası ilə müqayisəli analiz olunaraq zülalların orjinal nümunələrdə aşkar olunmasında istifadə olunur.

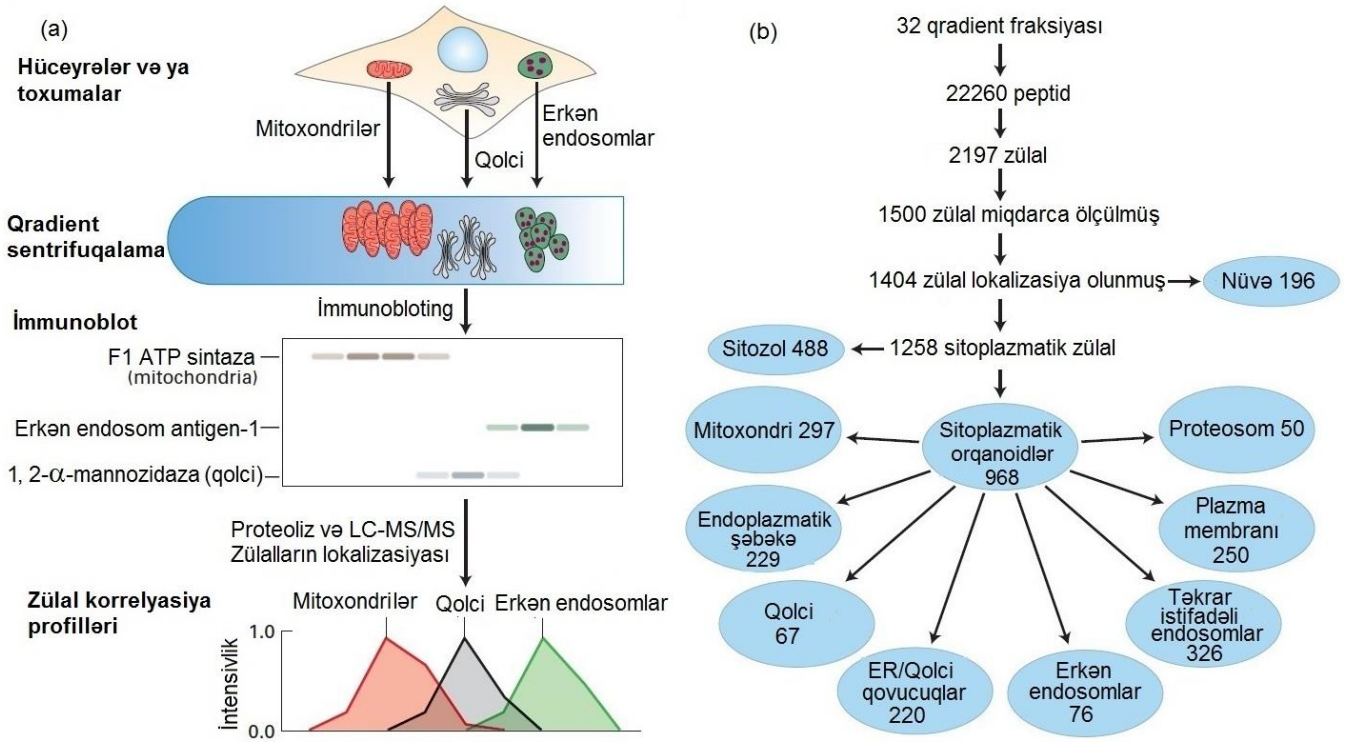
spektrometr daxilinə keçirilir (inyeksiya olunur). Sonra fraksiyalar, çoxlu miqdarda peptidlərin a.t. ardıcıllıqları təyin olunana qədər ardıcıl olaraq MS/MSin çoxsaylı tsikllərinə məruz qoyulur və alınan nəticələr verilənlər bazasındakılarla müqayisə olunaraq orjinal bioloji nümunədəki zülallar aşkar edilir. Bütöv hüceyrələrdə və ya toxumalarda zülalların kifayət qədər çox fraksiyasının aşkar edilməsi hal hazırda 50 µg-dan artıq zülalın olduğu nümunələri tələb edir, bu miqdar təxminən 70000-dən 200000-qədər məməli hüceyrəsinin tərkibindəki zülallara bərabərdir. Metodun həssaslığını artırmaq üçün cəhdlər davam edir, belə ki, sonda tək bir fərdi hüceyrə daxilində proteomonu analiz etmək mümkün olacaq.

Hər bir orqanoiddə zülalardan çoxunun identifikasiyasında LC-MS/MS-in istifadə olunmasına aid nümunə Şəkil 3-48-də görünür. Siçanın qaraciyər toxumasından ayrılan hüceyrələr orqanoidləri ayırmaq üçün mexaniki yolla dağıdılır və sonra orqanoidlər sıxlıq-qradienti sentrifuqalama yolu ilə qismən ayrılır. Orqanoidlərin qradientdə yeri, əvvəllər identifikasiya olunmuş orqanoid-spesifik zülalları tanıyan anticisimlərlə immunoblotinqdən istifadə edilməklə təyin edilir. Hər bir fraksiyada zülalları identifikasiya etmək üçün qradientdən alınan fraksiyalar LC-MS/MS analizinə məruz qoyulur və qradientdə olan çoxlu miqdarda fərdi zülalların paylanması orqanoidlərin paylanması ilə müqayisə olunmur. Bu strategiya, çox fərdi zülalların bir və ya daha artıq orqanoiddə təyin olunmasına imkan verdi (orqanoid proteoma profilinqi). Daha son zamanlar, orqanoid təmizlənməsinin, MS, biokimyəvi lokalizasiya və kompüter analizi metodlarının kombinasiyası istifadə olunaraq göstərilmişdir ki, insanın və siçanın mitoxondrisində ən azı 1000-dən artıq fərqli zülallar yerləşmişdir.

İndiki dövürdə proteomiks molekulyar genetikanın metodları ilə kombinasiyada eukariot hüceyrələrdə bütün zülal komplekslərinin təyin edilməsində istifadə edilir. Məsələn, *Saccharomyces cerevisiae* maya hüceyrəsində təxminən hər bir kompleksə orta hesabla 4.9 müxtəlif zülal düşməklə 500-ə qədər zülal kompleksləri identifikasiya olunmuşdur. Bu komplekslər öz növbəsində ən azı 400-ə qədər kompleksdən-kompleksə qarşılıqlı əlaqələrdə iştirak edirlər. Bu cürə sistematik proteoma tədqiqatları zülalların hüceyrə daxilində təşkilinin və hüceyrənin yaşaması və fəaliyyət göstərməsinə imkan vermək üçün zülalların birlikdə necə işləməsinin yeni ideyalarını yaratdı.

Kompleks qatışıqlarda zülalların fosforlaşma saytlarının identifikasiyası və miqdarını öyrənən **fosfoproteomiks** hüceyrə metabolizmi və onun tənzimlənməsinin analizində getdikcə artan

rol oynayır. Artıq bizim öyrəndiyimiz kimi, zülalların kinazalar və fosfatazalarla geriyə dönə bilən fosforlaşması zülalların hüceyrədə tənzimlənməsinin əsas mexanizmidir. Fosfoproteomiks çox zülalların fosforlaşma vəziyyətlərinin eyni zamanda təyin edilməsinə imkan verir, bununla da hüceyrənin mürəkkəb tənzimləyici şəbəkəsini analiz etmək üçün çox əhəmiyyətli bir vasitəni təmin edir. Xüsusi bir zülalın yalnız bir fraksiyası, çox hallarda kiçik bir fraksiyası fosforlaşa bilər. Beləliklə fosfoproteomiks analizləri standard proteomiksdən 50-100 dəfə artıq ilkin toxuma və ya hüceyrə materialını (hər bir nümunəyə 2.5-dən 20 mg qədər hüceyrə zülalı) tələb edə bilər. Bu səbəbdən tədqiqatçılar fosfopeptidləri LC-MS/MS analizlərdə istifadə etməzdən öncə fosfopeptidləri fosforlaşmamış peptidlərdən ayırmaq üçün (fosfopeptid zənginləşdirilməsi) adətən ya metal-saxlayan (məsələn, Fe^{3+} və ya TiO_2) ya da anticism-saxlayan kolonkalardan ibarət olan afin xromotoqrafiyası metodlarından istifadə edirlər



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 3-48 Sıxlıq-qradient sentrifuqalama və LC-MS/MS orqanoidlərdə çox zülalların identifikasiyasında istifadə olunur. (a) Qaraciyər toxumasının hüceyrələri orqanoidlərin buraxılması üçün mexaniki yolla dağıdılmışdır və orqanoidlər sıxlıq-qradienti sentrifuqalama yolu ilə qismən ayrılmışdır. Bütün qradient boyu yayılmış və bəzən qismən bir-biri ilə üst-üstə düşən orqanoidlərin yerləşməsi, əvəllər identifikasiya olunmuş, orqanoid-spesifik zülalları tanıyan anticismlərdən istifadə etməklə immunoblottinq yolu ilə təyin edilmişdir. Peptidləri və nəticədə hər bir fraksiyada zülalları identifikasiya etmək üçün qradientdən alınmış fraksiyalar proteolizə və LC-MS/MS-ə məruz qoyulmuşdur. Qradientdə orqanoidlərin yerləşməsi ilə müqayisə (zülal korelyasiyası profili adlanır) çox sayda fərdi zülalların bir və ya daha artıq orqanoiddə təyin olunmasına imkan verdi (orqanoid proteoma identifikasiyası). (b) (a)-hissəsinin proseslərindən alınmış məlumatların ierarxial dağılması. Qeyd etmək lazımdır ki, bütün identifikasiya olunmuş zülallar ayrı-ayrı orqanoidlərdə təyin oluna bilər, amma bəzi zülallar birdən artıq orqanoiddə təyin edilməmişdir. [Verilənlər L.J.Foster et al., 2006, *Cell*, 125(1):187-199 götürülmüşdür.]

3.6 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSIYALARI

Proteomiks

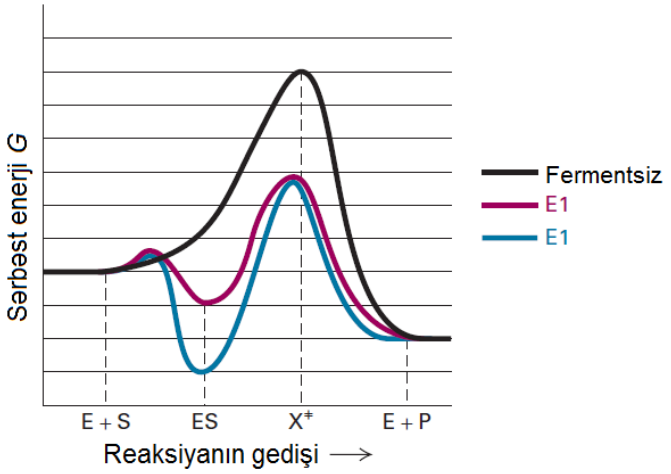
- Proteomiks, bütöv orqanizm, toxuma, hüceyrə və hüceyrədaxili səviyyələrdə bioloji sistemlərdə bütün zülalların və ya onların ayrı ayrı bölmələrinin miqdarını (və miqdarındakı dəyişiklikləri), modifikasiyaları, lokalizasiyasını və funksiyasını sistematik şəkildə öyrənir.
- Proteomiks zülalların hüceyrə səviyyəsində fundamental təşkilinin və bu təşkil olunmaya hüceyrənin vəziyyətinin (məsələn, müxtəlif hüceyrə tiplərinə differensasiya etmək, stressə cavab vermək, xəstəliklər və dərmanların təsiri) necə təsir etdiyini göstərən anlayışları təmin edir.
- Proteomiks analizlərində geniş müxtəliflikdə metodlar, o cümlədən iki-ölçülü gel elektroforezi, sıxlıq-qradienti sentrifuqalama və mass spektroskopiya (xüsusilə də LC-MS/MS) istifadə olunur.
- Proteomiks, orqanoidlərin proteomasının təyininin başlanmasına ("orqanoid proteoma profilinqi") və fərdi zülalların multizülal komplekslərdə yerləşməsinin identifikasiyasına kömk etdi (bax Şəkil 3-48).
- Fosfoproteomiks proteomiksin xüsui bir tətbiqi olub, fosforlaşmış zülalların (fosfoproteomo) hüceyrədə toplusunu identifikasiya edir və hüceyrənin dəyişilmiş vəziyyəti ilə bu zülalların fosforlaşması səviyyəsinin necə dəyişilməsini xarakterizə edir

Açar sözlər

allosteriya
amiloid filament
avtoradioqrafiya
çaperon
domen
dördüncü quruluş
elektroforez
ferment
fəal mərkəz
fəallaşma enerjisi
fosforlaşma
homologiya
ikinci quruluş
ilkin (birinci) quruluş
kinaza
K_m
konformasiya
kooperativlik
liqand
maye xromotoqrafiya
motif
peptid əlaqəsi
polipeptid
proteasom
proteoma
proteomiks
rentgen-kristalloqrafiya
ubikvitin
V_{max}
üçüncü quruluş
Vestern blottinq
zonal-sürət sentrifuqalama
zülal
α spiral
β dönmə
β fərəq

Konsepsiyalara Baxış

1. Zülalın üç-ölçülü quruluşu onun ilkin (birinci), ikinci və üçüncü quruluşları ilə təyin olunur. *Birinci, ikinci və üçüncü quruluşları* təyin et. İkinci quruluşda ümumi olan nədir? İkinci və üçüncü quruluşları büküb saxlayan hansı qüvvələrdir?
2. Zülalların düzgün bükülməsi onların bioloji fəallıqları üçün vacibdir. Ümumiyyətlə, zülalın funksional konformasiyası onun aşağı enerjiyə malik olan konformasiyasıdır. Bu onu göstərir ki, bükülməmiş zülal tarazlığa çatmalıdır, o avtomatik olaraq özünün nativ, funksional bükülmüş vəziyyətini almalıdır. Bəs nəyə görə hüceyrəyə molekulyar çaperon və çaperoninlər lazımdır? Zülalların bükülməsində çaperon və çaperoninlər hansı müxtəlif rolları həyata keçirirlər?
3. Fermentlər kimyəvi reaksiyaları kataliz edirlər. Fermentin fəal mərkəzini təyin edən nədir? Fermentin geriyə dönmək (k_{cat}), Mixayles konstantı (K_m), və maksimal sürəti (V_{max}) nədir? Karbon anhidraza üçün k_{cat} 5×10^5 molekul\saniyədir. Bu "sürət konstantı"dır amma "sürət" deyil. Bunların fərqi nədir? Reaksiya məhsulunun əmələ gəlməsinin əsil sürətini (V) təyin etmək üçün bü "sürət konstantı"nı hansı qatılığa vurmalısan? Hansı şəraitdə bu sürət fermentin maksimal sürətinə (V_{max}) bərabər olacaq?
4. Aşağıdakı reaksiyanın diaqramının kordinatı substrat molekulunun (S) enerjisini göstərir, o stabil məhsul (P) olmaq üçün yolu üstündə olan tək bir və ya bir neçə fermentin (E1 və E2) iştirak etdiyi keçici vəziyyəti ($X^{\ddagger}$) keçir. Bu və ya digər fermentin əlavə olunması reaksiyada Gibbsin sərbəst enerjisinin (ΔG) dəyişməsinə necə təsir edəcək? İki fermentdən hansı substrata daha
yüksək affinlikə birləşəcək? Hansı ferment keçeci vəziyyəti daha yaxşı stabilləşdirir? Hansı ferment katalizator kimi daha yaxşı fəaliyyət göstərir?



5. Sağlam adaptiv immun sistemi, istəmilən stabil molekulu tanıyaraq yüksək uyğunluqla ona birləşə bilən anticismləri yarada bilir. Anticismin birləşdiyi molekul "antigen" kimi tanınır. Tədqiqatlar, diaqnoz və müalicələr zamanı anticismlər əhəmiyyətli vasitə kimi istifadə olunmaq üçün təşəbbüskar alimlər tərəfindən öyrənilmişdir. Ağıllı tətbiqlərdən biri, mürəkkəb kimyəvi reaksiyaları kataliz edən ferment kimi fəaliyyət göstərərn anticismlərin yaradılmasıdır. Əgər siz belə bir katalitik anticism yaratmaq istəsəz antigen kimi istifadə etməyə nəyi məsləhət görərdiniz? Bu reaksiyanın substratı-mı olmalıdır? Yoxsa reaksiya məhsul-mu olmalıdır? Ya başqa nə ola bilər?
6. Zülallar hüceyrədə parçalanır. Ubikvitin nədir və zülalların parçalanmaq üçün nişanlanmasında (yarlıklanmasında) o hansı rolu oynayır? Proteasom ingibitorları kemoterapevtik (xərçəng müalicə edən) agent kimi necə xidmət edə bilər?
7. Zülalların fəaliyyəti bir sira yollarla tənzimlənə bilir. Kooperativlik nədir və o, zülalların fəaliyyətinə necə təsir edir. Zülalların fosforlaşmasının və proteolitik doğranmasının zülalların funksiyasını necə modulyasiya etdiyini təsvir edin.

8. Bir sıra metodlar zülalları onların kütlələrində olan fərqə görə ayırır. Bu metodlardan ikisinin - sentrifuqalama və gel elektroforezin istifadə olunmasını təsvir edin. Qan zülalı transferin (MÇ 76 kDa) və lizozim (MÇ 15 kDa) sürət-zonal sentrifuqalama və ya SDS-poliakrilamid gel elektroforezi ilə ayrıla bilər. Sentrifuqalama zamanı bu iki zülaldan hansı daha tez (sürətlə) sedmentasiya edəcək? Elektroforez zamanı bunlardan hansı daha sürətlə miqrasiya edəcək?
9. Xromotoqrafiya zülalların ayrılmasında istifadə olunan analtik metoddur. Gel filtrasiya, ion-mübadiləsi və affin xromotoqrafiyaları ilə zülalların ayrılması prinsiplərini təsvir edin.
10. Zülalların aşkar olunması üçün müxtəlif metodlar inkişaf etdirilmişdir. Zülalların aşkar olunmasında və nişanlanmasında radioizotopların və avtoradioqrafiyanın necə istifadə olunduğunu təsvir edin. Vesterin blottinq zülalları necə aşkar edir?
11. Zülalların konformasiyasını təyin etmək üçün fiziki metodlardan tez-tez istifadə olunur. Rentgen-kristalloqrafiyanın, krioelektron mikroskopiyanınn və NMR spektroskopiyanın zülalların formalarının təyin olunmasında necə istifadə olunduqlarını təsvir edin. Bu metodların üstünlükləri və çatışmayan cəhətləri nədən ibarətdir? Kiçik zülallar üçün onlardan hansı daha yaxşıdır? Böyük zülallar üçün hansı daha yaxşıdır? Çox böyük makromolekullar üçün hansı daha yaxşıdır?
12. Mass spektrometr proteomiks üçün çox güclü alətdir. Mass spektrometrin dörd əsas xüsusiyyəti hansılardır? Zülalların normal sağlam hüceyrələrdə deyil xərçəng hüceyrələrində ekspressiya olunduğunu təyin etmək üçün, MALDI və iki-ölçülü poliakrilamid gel elektroforezindən (2D-PAQE) necə istifadə olunduğunu qısaca təsvir edin.

İstinadlar

Veb Saytlar

Zülallara, quruluşa, genomlara və taksonmiya giriş saytı: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/
Zülalın 3-D quruluş verilənlər bazası: http://www.rcsb.org/
Zülalların quruluşuna görə təsnifləşdirilməsi: http://scop.berkeley.edu/
Zülallar haqqında ümumi məlumatı saxlayan saytlar: http://www.expasy.ch/; http://www.proweb.org/; http://scop.berkeley.edu/intro.html
Zülal ailələrinin və domenlərinin PROSITE verilənlər bazası: http://www.expasy.org/prosite/
Zülalların domen təşkili və çoxsaylı ardıcıllıq düzlənməsinin böyük kolleksiyası: http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/; http://people.cryst.bbk.ac.uk/,ubcg16z/cpn/elmovies.html
MitoCarta: Məməlilərin mitoxondrial geminin inventorizasiyası: http://www.broadinstitute.org/pubs/MitoCarta/index.html
İnsanın zülal atlası, zülalların müxtəlif toxumalarda ekspressiyası ilə: http://www.proteinatlas.org/

Zülalların ierarxial quruluşu

Dunker, A. K., et al. 2015. Intrinsically disordered proteins and multicellular organisms. *Semin. Cell Dev. Biol.* **37**:44–55.
Levitt, M. 2009. Nature of the protein universe. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **106**:11079–11084.
Patthy, L. 1999. *Protein Evolution.* Blackwell Science.
Vogel, C., and C. Chothia. 2006. Protein family expansions and biological complexity. *PLoS Comput. Biol.* **2**(5):e48.
Yaffe, M. B. 2006. “Bits” and pieces. *Sci. STKE* **2006**:pe28.

Zülalların Bükülməsi

Brandvold, K. R., and R. I. Morimoto. 2015. The chemical biology of molecular chaperones—implications for modulation of proteostasis. *J. Mol. Biol*. **427**:2931–2947.
Coulson, A. F., and J. Moult. 2002. A unifold, mesofold, and superfold model of protein fold use. *Proteins* **46**:61–71.
Daggett, V, and A. R. Fersht. 2003. Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends Biochem. Sci.* **28**:18–25.
Dobson, C. M. 1999. Protein misfolding, evolution, and disease. *Trends Biochem. Sci*. **24**:329–332.
Jackrel, M. E., et al. 2014. Potentiated Hsp104 variants antagonize diverse proteotoxic misfolding events. *Cell* **156**:170–182.
Knowles, T. P., M. Vendruscolo, and C. M. Dobson. 2014. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **15**:384–396.
Lavery, L. A., et al. 2014. Structural asymmetry in the closed state of mitochondrial Hsp90 (TRAP1) supports a two-step ATP hydrolysis mechanism. *Mol. Cell* **53**:330–343.
Saibil, H. 2013. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**:630–642
Schmidpeter, P. A., and F. X. Schmid. 2015. Prolyl isomerization and its catalysis in protein folding and protein function. *J. Mol. Biol*. **427**:1609–1631.
Taipale, M., D. F. Jarosz, and S. Lindquist. 2010. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **11**:515–528.
Valastyan, J. S., and S. Lindquist. 2014. Mechanisms of proteinfolding diseases at a glance. *Dis. Model Mech*. **7**:9–14.

Zülalların Birləşməsi və Fermentativ Kataliz

Fersht, A. 1999. *Enzyme Structure and Mechanism*, 3d ed.W. H. Freeman and Company.
Martínez Cuesta, S., et al. 2015. The classification and evolution of enzyme function. *Biophys. J.* **109**:1082–1086.
Radisky, E. S., et al. 2006. Insights into the serine protease mechanism from atomic resolution structures of trypsin reaction intermediates. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:6835–6840.

Zülalların Funksiyasının Tənzimlənməsi

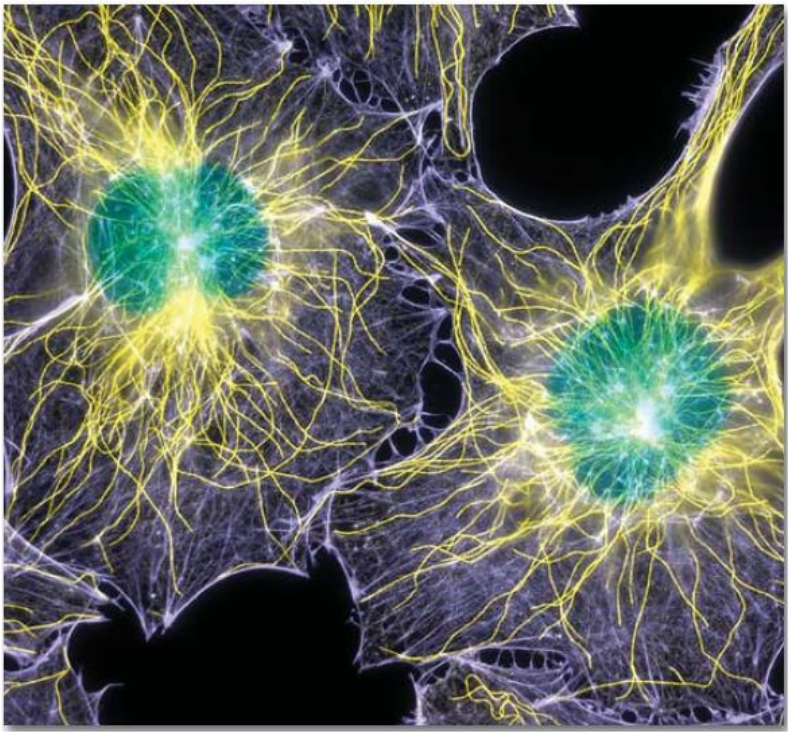
Bellelli, A., et al. 2006. The allosteric properties of hemoglobin: insights from natural and site directed mutants. *Curr. Prot. Pep. Sci.* **7**:17–45.
Campbell, M. G., et al. 2015. 2.8 Å resolution reconstruction of the *Thermoplasma acidophilum* 20S proteasome using cryo-electron microscopy. *eLife*. 10.7554/eLife.06380.
Glickman, M. H., and A. Ciechanover. 2002. The ubiquitinproteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev*. **82**:373–428.
Goldberg, A. L, S. J. Elledge, and J. W. Harper. 2001. The cellular chamber of doom. *Sci. Am.* **284**:68–73.
Goldberg, A. L. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**:895–899.
Kern, D., and E. R. Zuiderweg. 2003. The role of dynamics in allosteric regulation. *Curr. Opin. Struc. Biol*. **13**:748–757.
Kisselev, A. F., A. Callard, and A. L. Goldberg. 2006. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J. Biol. Chem.* **281**:8582–8590.
Lim, W. A. 2002. The modular logic of signaling proteins: building allosteric switches from simple binding domains. *Curr Opin. Struc. Biol.* **12**:61–68.
Sahtoe, D. D., and T. K. Sixma. 2015. Layers of DUB regulation. *Trends Biochem. Sci.* **40**(8):456–467.
Sowa, M. E., et al. 2009. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell* **138**:389–403.

Zülalların Aşkarlanması, Təmizlənməsi və Xarakterizasiyası

Engen, J. R., et al. 2013. Partial cooperative unfolding in proteins as observed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Int. Rev. Phys. Chem.* **32**:96–127.
Hames, B. D. *A Practical Approach.* Oxford University Press. A methods series that describes protein purification methods and assays.
Liao, M, et al. 2014. Single particle electron cryo-microscopy of a mammalian ion channel. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **27**:1–7.
Nogales, E., and S. H. Scheres. 2015. Cryo-EM: a unique tool for the visualization of macromolecular complexity. *Mol. Cell* **58**:677–689.
Rosenzweig, R., and L. E. Kay. 2014. Bringing dynamic molecular machines into focus by methyl-TROSY NMR. *Annu. Rev. Biochem.* **83**:291–315.
Zhang, G., et al. 2014. Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry. *Curr. Protoc. Mol. Biol*. **108**:10.21.1–10.21.30.

Proteomiks

Azimifar, S. B., et al. 2014. Cell-type-resolved quantitative proteomics of murine liver. *Cell Metab*. **20**:1076–1087.
Calvo, S. E., and V. K. Mootha. 2010. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **11**:25–34.
Cox, J., and M. Mann. 2011. Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology. *Annu. Rev. Biochem.* **80**:273–299.
Foster, L. J., et al. 2006. A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell* **125**:187–199.
Krogan, N. J., et al. 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**:637–643.
Rifai, N., M. A. Gillette, and S. A. Carr. 2006. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nature Biotechnol.* **24**:971–983.
Roux, P. P., and P. Thibault. 2013. The coming of age of phosphoproteomics—from large data sets to inference of protein functions. *Mol Cell Proteomics*:**12**:3453–3464.
Walther, T. C., and M. Mann. 2010. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J. Cell Biol*. **190**:491–500.



Fluoressensiya mikroskopiyası iki kultura olunan hüceyrədə DNT-ni (yaşıl), mikroborucuqları (sarı) və mikrofilamentləri (bənövşəyi) göstərir. Hüceyrələr kimyəvi fiksasiya olunmuş və sonra zəif detergentdən istifadə edərək anticismlər üçün keçirici edilmişdir. Mikroborucuqlar tubulinə olan anticismlə rənglənmişdir; mikrofilamentlər F-aktinə selektiv birləşən nişanlanmış toksin falloidinlə rənglənmişdir, DNT isə DNT birləşdirən rənglə vizuallaşdırılmışdır. [Torsten Wittman, University of California, San Francisco]

FƏSİL

4

Hüceyrələrin Kulturası və Vizuallaşdırılması

Inanmaq olmur ki, 400 il bundan əvvəl bütün canlı aləmin hüceyrələrdən təşkil olunduğu məlum deyidir. 1655-ci ildə Robert Huk primitiv mikroskopdan istifadə edərək tıxacı tədqiq etmiş və sıra ilə düzülmüş altıguşəli quruluşu – ölmüş bitki hüceyrsi divarlarını görmüşdür, o bunu monastırdə rahiblərin hücrələrinə (cells) bənzətmişdir, ona görə də Huk onları *hücrələr* (*cells*) (hüceyrələr) adlandırmışdır. Bundan az sonra, Antoni Levenhuk öz sadə mikroskopunda gördüyü heyvanları təsvir etdi, bu canlı hüceyrənin ilk təsviri oldu. İkiyüz il sonra, Mathias Şleyden və Teodor Şvann müşahidə etdilər ki, ayrı-ayrı fərdi hüceyrələr çoxsaylı müxtəlif bitkilərdə, heyvanlarda və bir-hüceyrəli orqanizmlərdə həyatın fundamental vahidini təşkil edirlər. Bunlar ümumilikdə biologiyada çox böyük bir kəşf oldu və belə bir sualın yaranmasına səbəb oldu ki, hüceyrələr necə təşkil olunur və necə fəaliyyət göstərirlər.

Amma, hətta bu gün çoxsaylı texniki çatışmazlıqlar hüceyrələrin intakt heyvanlarda və bitkilədə öyrənilməsinə çətinlik törədir. Alternativ bir yanaşma heyvanlardan ayrılmış və fizioloji inteqrasiyasını və funksiyasını saxlamaq üçün işlənilmiş intakt orqanların istifadəsidir. Amma, orqanların təşkili, hətta ayrılmış orqanlarınki çoxsaylı tədqiqat problemlərinin qoyulması üçün kifayət qədər mürəkkəbdir. Beləliklə, molekulyar hüceyrə bioloqları tez-tez hallarda, orqanizmlərdən ayrılmış hüceyrələr üzərində eksperimental tədqiqatlar edirlər. 4.1 bölməsində biz, çox geniş müxtəliflikdə hüceyrə tiplərinin necə saxlanılmasını və inkişaf etdirilməsini və spesifik hüceyrə tipinin kompleks (mürəkkəb) qatışıqdan necə ayrılmasını öyrənirik.

Çox hallarda, ayrılmış hüceyrələr, laboratoriyada onların yaşamaq və arta bilmək şəraitində saxlanıla bilir, bu prosesə *kultura olunma* deyilir. Kultura olunan hüceyrələr hüceyrə biologiyası tədqiqatları üçün intakt orqanizmlərlə müqayisədə bir sıra üstünlüklərə malikdir. Tək bir spesifik hüceyrə tipi kulturada arta bilir, eksperimentin şəraiti asanlıqla və daha yaxşı nəzarət oluna bilir və çox hallarda vahid bir hüceyrə asanlıqla artaraq çox sayda eyni hüceyrənin koloniyasına çevrilə bilir. Nəticədə, hüceyrənin genetik cəhətdən homogen olan alınmış ştammı **klon** adlanır. Amma, kulturada olan hüceyrələr onların təbii vəziyyətdəki yerlərində deyillər və ona görə də, biz tədqiqatçıların hüceyrələri onların heyvan orqanizmindəki vəziyyətə daha yaxın oxşatmaq üçün necə yetişdirdiklərini və üç-ölçülü mühitdə necə yoxladıqlarını müzakirə edirik.

QISA İCMAL

4.1 Hüceyrələrin Kulturada Artırılması və Öyrənilməsi
4.2 İşıq Mikroskopu: Hüceyrə quruluşunun Tədqiqi və Zülalların Hüceyrə Daxilində Aşkar Olunması
4.3 Elektron Mikroskopu: Yüksək Keyfiyyətli (Rezolyusiyalı) Görüntüləmə
4.4 Hüceyrə Orqanoidlərinin Ayrılması

Hüceyrənin təşkili barədə kəşflər həm işıq həm də elektron mikroskopunun inkişafı ilə sıx şəkildə bağlı olmuşdur. Bu, 400 il bundan öncə olduğu kimi indi də həqiqətdir. İşıq mikroskopu ilkin olaraq, hüceyrələrin çox gözəl daxili təşkilini aşkar etdi, bu gün isə hüceyrələrin fəaliyyət göstərdiyi molekulyar mexanizmləri aşkar etmək məqsədi ilə getdikcə daha da dərinliklərə doğru tədqiq etmək üçün yüksək inkişaf etmiş mikroskoplar davamlı şəkildə təkmilləşdirilir. 4.2 bölməsində, biz işıq mikroskopiyanı və mümkün olan digər texnologiyaları, çoxdankı, amma hələ də qiymətli olan metodları müzakirə edirik və sonra, bu vaxta qədər inkişaf etdirilmiş ağıllı metodları izləyirik daha yeni, qabaqcıl texnologiyalarla yekunlaşdırırıq. Əsas inkişaf 1960-cı və 1970-ci illərdə, verilmiş hüceyrə daxilində spesifik zülalların lokalizasiyasına imkan verən *immunofluoressens mikroskopiyanın* yaranıb inkişaf etdirilməsi ilə başlandı ki, bu da həmin zülalların yerləşməsi barədə bu fəsilin açılış şəkilində təsvir olunmuş statik şəkilin yaranmasına imkan verdi. Bu cürə tədqiqatlar, hər bir orqanoid tipinin onun unikal funksiyalarını həyata keçirmək üçün membranlarında və daxili böşluqlarında fərqli zülallar qrupuna malik olmaları barədə əhəmiyyətli bir konsepsiyanın yaranmasına səbəb oldu. Digər böyük bir irəliləyiş 1990-cı illərin ortalarında, maraq zülallarının təbii fluoressent zülallara kovalent birləşməsi ilə yaranan *ximer zülalların* ekspressiya olunması ideyasının yaranması oldu, bu da bioloqlara canlı hüceyrə daxilində fərdi zülalların yerini və yerdəyişmələrini vizuallaşdırmağa imkan verdi. Birdən-birə hüceyrələrin dinamik təbiəti qiymətləndirilə bildi, hüceyrələrin görünüşü onların mümkün olan əvvəlki statik təsvirlərindən dəyişildi. Bundan əlavə, o bir texnoloji çağırışı da meydana qoydu: fluoressent zülalları təyin etmək üçün daha həssas mikroskop yarandıqca tədqiqatçılar verilənlərdən (nəticələrdən) daha çox informasiyanı əldə edə bildilər. O həmçinin, canlı hüceyrələrdə zülal-zülal qarşılıqlı əlaqənin monitorinqi üçün və eləcədə, indi bizim burada bəzilərini müzakirə edəcəyimiz digər saysız-hesabsız inkişaf etmiş texnologiyalar üçün fluoressent metodların inkişafını aşkar etdi. On illər boyu işıq mikroskopiyası görünən işığın dalğa uzunluqlarının imkan verdiyi məhdudiyyətlərə görə, işıq mikroskopunun imkan verdiyi rezolyusiya daxilində – təxminən 200 nm ölçü daxilində məhdud idi. Biz bu rezolyusiya baryerini qırıb keçmək üçün son bir neçə il ərzində inkişaf etdirilmiş metodları *super-rezolyusiyalı mikroskopiyanı* müzakirə edirik.

İşıq mikroskopunun heyranedici inkişafına baxmayaraq, görünən işıq hüceyrənin ultraquruluşunun detallarını tədqiq etmək üçün çox aşağı imkanlı görünüşü təmin edir. Elektron mikroskopy çox yüksək imkanları verir, amma texnalogiya ümumən tələb edir ki, hüceyrə fiksasiya olunsun və hissələrə ayrılsın, beləliklə bütün hüceyrə hərəkətləri zaman müddətində donmuş olsun. Elektron mikroskupu həmçinin tədqiqatçılara makromolekulyar komplekslərin və ya tək bir makromolekulun quruluşunu tədqiq etməyə imkan verir. 4.3-cü bölmədə biz, nümunələrin elektron mikroskopunda müşahidə etməik üçün hazırlanmasının müxtəlif yanaşmalarını müzakirə edirik və bundan alına bilən nəticələrin tiplərini təsvir edirik.

İşıq və elektron mikroskopları aşkar etdilər ki, bütün eukariot hüceyrələr – istər göbələk, istərsə də bitki və ya heyvan mənşəli olsun, hamısı **orqanoidlər** adlanan membranla-məhdudlaşan oxşar kompartment repertuarına malikdirlər. Mikroskopun inkişafı ilə paralel olaraq, subhüceyrə fraksiyalarını ayrmaq metodları da inkişaf etdirilmişdir, bu da hüceyrə bioloqlarına fərdi orqanoidləri yüksək təmizlik dərəcəsində ayırmağa imkan vermişdir. Detalları 4.4-cü bölməd verilmiş bu metodlar, orqanoidlərin zülal tərkibi və fəaliyyəti barədə əhəmiyyətli məlumatları təmin etməkdə davam edir.

4.1 Hüceyrələrin Kulturada Artırılması

Hüceyrələrin öyrənilməsində onların kulturada yetişdirilməsi ilə güclü imkanlar yaranır, onlar burada mikroskop altında tədqiq oluna bilər və nəzarət olunan şəraitdə spesifik təsirlərə məruz qoyula bilir. Ümumiyyətlə, birhüceyrəli bakteriaların, göbələklərin və ya ibtidai hüceyrələrin yetişdirilməsi, məsələn, onları onların böyüməsini təmin edən zəngin mühitə keçirilməklə kifayət qədər asandır. Amma, heyvan hüceyrələtri çoxhüceyrəli orqanizmlərdən alınmışdır, bu da onları tək və ya kiçik hüceyrələr qrupu şəkilində kultura etməyə çətinlik törədir. Bu bölmədə, biz heyvan hüceyrələrinin kulturada necə artdığını və müxtəlif hüceyrə tiplərinin tədqiqat üçün necə təmizlənib hazırlana biləcətini müzakirə edirik.

Hevan Hüceyrələrinin Kulturası Zəngin-Qidalanma Mühitini və Xüsusi Bərk Səthi Tələb Edir

Kultura olunmuş toxumalara və ya hüceyrələrə normal funksiya və sağ qalmaq qabliyyətini vermək üçün temperatur, pH, ion gücü və əsas qida maddələrinin əldə olunması onları imkan daxilində intakt orqanizmlərdə olduğu qədər yaxından stimullaşdırmalıdırlar. Ayrılmış heyvan hüceyrələri adətən, xüsusi örtüyə malik olan plastik qablarda və ya kolbalarda kultura mühiti adlandırılan qida ilə zəngin maye mühitə yerləşdirilir. Kulturalar, temperaturun, atmosferin və rütubətin nəzarət oluna biləcəyi inkubatorda saxlanılır. Bakterial və ya göbələk çirklənməsi ehtimalının qarşısını almaq üçün bir qayda olaraq kultura mühitinə antibiotiklər əlavə edilir. Çirklənməyə qarşı daha da dərin mühafizə olunmaq üçün tədqiqatçılar adətən qablar arasında hüceyrənin yerini dəyişərkən və ya qida mühiti əlavə edərkən xüsusi, filtirlənməklə mikroorqanizmləri və hava ilə gələn başqa çirklənmələri uzaqlaşdırmaqla təmizlənən hava sirkulyasiyasına malik olan steril kabinetlərdə edirlər.

Kultura olunan heyvan hüceyrələri üçün mühit, onurğalıların yetkin orqanizmləri tərəfindən sintez oluna bilməyən doqquz amin turşuları (fenilalanin, valin, treonin, triptofan, izoleysin, metionin, leysin, lizin və histidin) ilə təmin edilməlidir. Bundan əlavə, kultura olunan hüceyrələrin əksəriyyəti, intakt heyvan orqanizmində yalnız xüsusiləşmiş hüceyrələrdə sintez olunan üç əlavə amin turşusunu (sistein, tirozin və arginin) və həmçinin azot mənbəyi rolunu oynayan qlutamini də tələb edir. Heyvan hüceyrələrini kultura etmək üçün mühitin tələb olunan digər əhəmiyyətli komponentləri vitaminlər, müxtəlif duzlar, yağ turşuları, qlükoza və qan zərdabıdır (qan laxtalandıqdan sonra qalan hüceyrəsiz qan mayes plazmadır). Zərdabda, məməlilərin kultura olunan hüceyrələrinin kulturada proliferasiyası üçün lazım olan müxtəlif zülal faktorları, o cümlədən polipeptid hormon insulin, dəmiri bioloji əldəedilən vəziyyətdə təmin edən transferin, və bir sıra boy faktorları vardır. Bundan əlavə, müəyyən hüceyrə tipləri zərdabda olmayan xüsusi zülal boy faktorlarını tələb edir.

Məsələn, qırmızı qan hüceyrələrinin əcdadı (yaradıcısı) eritropoetini, T limfositlər isə interleykin 2-ni tələb edirlər (bax Fəsil 16). Bir neçə məməli hücerə tipləri, kimyəvi təyin olunmuş, zərdabsız, amin turşularına, qlükozaya, vitaminlərə və duzlarla birlikdə bir sıra cüzi minerallara, spesifik zülal faktorlarına və başqa komponentlərə malik olan mühütdə çoxala bilirlər.

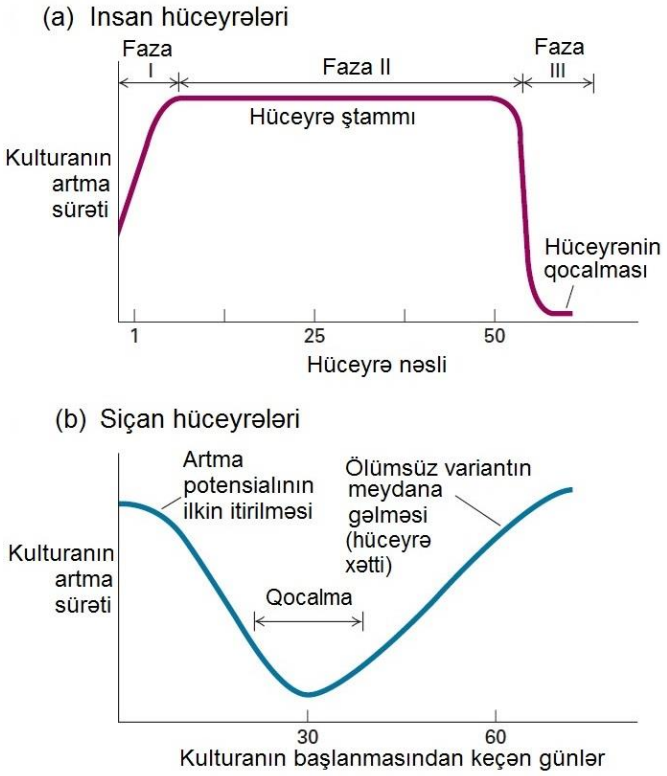
Suspenziyada çoxala bilən bakterial və maya hüceyrələrindən fərqli olaraq, əksər heyvan hüceyrə tipləri bərk səthə yapışmış şəkildə çoxala bilir. Bu tələbat, hüceyrə-adgeziya molekulları (cell-adhesion molecules – CAM) adlanan hüceyrə-səth zülallarının əhəmiyyətini qabardır, çünki hüceyrə bunları yaxınlıqdakı qonşu hüceyrələrəyə və hüceyrəxarici matrisanın (extracellular matrix – ECM) kollagen və ya fibronektin kimi komponentylərinə birləşmək üçün istifadə edir (bax Fəsil 20). Bərk böyümə səthi (adətən şüşə və ya plastik) bu ECM zülallarla örtürlər və onlar ya zərdabdan əmələ gəlirlər ya da kulturada olan hüceyrələr tərəfindən ifraz olunurlar. Şüşə və ya plastik qabda kultura olunan tək bir hüceyrə, çoxalma sürətindən asılıl olaraq 4 – 14 gün müddətində artaraq, genetik cəhətdən eyni olan minlərlə hüceyrələrdən ibarət olan, gözlə görünə bilən kütləni və ya *koloniyanı* yaradırlar. Hərçənd ki, əksər heyvan hüceyrələri kulturada çoxalmaq üçün səth tələb edirlər, amma bəzi ixtisaslaşmış qan hüceyrələri və şiş hüceyrələri tək hüceyrələr kimi suspenziyada çoxala və ya saxlanıla bilirlər.

İlkin Hüceyrə Kulturaları və Hüceyrə Ştammları Məhdud Həyat Tsiklinə Malikdirlər

İlkin hüceyrələr birbaşa toxumadan ayrılan hüceyrələrdir. Normal heyvan toxuması (məsələn, dəri, böyrək, qaraciyər) və ya bütöv rüşeym ümumilikdə *ilkin hüceyrə kulturalarını* yaratmaq üçün istifadə olunurlar. İlkin kultura üçün fərdi toxuma hüceyrələrini ayırmaq üçün hüceyrə-hüceyrə və hüceyrə-matrisa əlaqələri qırılmalıdır. Bunu etmək üçün toxuma fraqmentləri proteazaların kombinasiyası (məsələn tripsin, kollagen-hidroliz edən ferment kollagenaza, və ya hər ikisi) və mühitdən sərbəst Ca^{2+} tutan ikivalentli kation çelatorlar (məsələn EDTA) ilə işlənilir. Çox CAM-lar kalsiumu tələb edirlər, ona görə də kalsiumu uzaqlaşdıranda qeyri fəal olurlar, kalsiumdan asılı olmayan başqa hüceyrı-yapışdıran molekullar hüceyrələri ayırmaq üçün proteoliz olunmalıdırlar. Azad olunmuş hüceyrələr sonra qida maddələri ilə zəngin, qablara və bir-birinə yapışa bilməsi üçün zərdabla təmin olunmuş kultura qablarına yerləşdirilir. Eyni proteaza-çelator məhlul, biokimyəvi tədqiqatlarda istifadə etmək və ya subkultura etmək (başqa qablara köçürmək) üçün yapışmış hüceyrələrin kultura qablarından ayırlmasında da istifadə olunur.

Fibroblastlar birləşdirici toxumalarda üstünlük təşkil edən hüceyrələrdir və normal halda, CAM-ları birləşdirən və bununla da hüceyrəni qabın səthinə yapışdıran kollagen kimi ECM komponentləri istehsal edirlər. Kulturada, fibroblastlar adətən toxumadan ayrılmış başqa hüceyrələrdən daha sürətlə bölünürlər, və əgər başqa tip hüceyrələri ayırmaq məqsədi ilə onlar xüsusi olaraq kulturadan uzaqlaşdırılmasa tədricən ilkin kulturada üstünlük təşkil edən hüceyrə tyipinə çevrilirlər.

Rüşeyimdən və ya yetkin heyvandan çıxarılan hüceyrələr kultura olunarrkən yapışqan hüceyrələrin əksəriyyəti məhdud sayda bölünəcək və çoxalmanı dayandıracaq (hüceyrə qocalması baş verəcək). Məsələn, insanın rüşeyim fibroblastı təxminən 50 dəfə bölündükdən sonra dayanır (Şəkil 4-1a). 10^6 hüceyrə ilə başladıqda 50 dəfə ikiləşmə potensial olaraq $10^6 \times 2^{50}$, və ya 10^{20}-dən artıq hüceyrə alınır ki, bu da təxminən min insanın çəkisinə bərabərdir. Normaıl halda, bu hüceyrələrin yalnız çox kiçik bir fraksuyası hər hansı bir eksperimentdə istifadə olunur. Beləliklə, baxmayaraq ki, onun həyat dövrü məhduddur, əgər bir kultura ehtiyatla saxlanılarsa çox sayda hüceyrə nəslində tədqiq oluna bilər. Əsasını tək bir ilkin hüceyrə kulturasından götürən bu cürə hüceyrə xətləri **hüceyrə ştammları** adlanır.



ŞƏKİL 4-1 Hüceyrə kulturasının yaradılmasının mərhələləri. (a) Hüceyrələr insan toxumasından ayrılanda ilkin olaraq kultura olunur, bəzi hüceyrələr ölür, bəziləri isə (xüsusən də fibroblastlar) inkişaf etməyə başlayırlar; ümumilikdə inkişaf sürəti artır (faza I). Əgər qalan hüceyrələr toplanaraq durulaşdırılarsa, yenidən tərar-təkrar qablara əkilərsə, hüceyrə ştammı sabit şəkildə təxminən 50 hüceyrə nəsli bölünməkdə davam edir (faza II), bundan sonra inkişaf sürəti kəskin surətdə düşür. Sonrakı dövrdə (faza III), kulturada olan bütün hüceyrələr inkişafdan dayanırlar (qocalma). (b) Siçandan və başqa gəmiricilərin hüceyrələrindən hazırlanmış kulturada ilkin hüceyrə ölümü (burada göstərilmir) sağlam inkişaf dən hüceyrələrin yaranması ilə birləşir. Bu bölünən hüceyrələr durulaşdırılan kimi və inkişafın davam etməsinə imkan verən kimi onlar tezliklə inkişaf potensialını itirməyə başlayırlar və əksəriyyəti inkişafdan dayanır (başqa sözlə, kultura qocalır). Çox nadir hüceyrələr onkogen mutasiyalara uğrayırlar, bu da onların sağ qalmasına imkan verir və bu nəsil hüceyrələr bölünərək kulturada həddən artıq çoxalırlar. Bu hüceyrələr, əgər müvafiq şəkildə durulaşdırılarsa və qidalandırılarsa sonsuz dərəcədə bölünüb inkişaf edə bilən hüceyrə xəttini təşkil edirlər. Belə hüceyrələrə ölməz hüceyrələr deyilir.

Normal hüceyrələrin məhdud həyatında çox əhəmiyyətli bir istisna *rüşeyim sütun hüceyrələrin* olmasıdır, adından göründüyü kimi, rüşeyimdən alınır və inkişaf zamanı bölünərək

bütün toxumaların yaranmasına səbəb olur. Fəsil 21-də bizim müzakirə edəcəyimiz kimi, rüşeyim sütun hüceyrələri, müvafiq şəraitdə sonsuz dərəcədə kultura oluna bilər

Hüceyrə ştammları ilə tədqiqatın aparılması onları dondura bilmək və donunu uğurla yenidən açıb sonrakı eksperimental analizlər üçün artıra bilmək qabliyyəti ilə sadələşdirilmişdir. Hüceyrə ştammları dayandırılmış animasiya vəziyyətində dondurula bilər və uzun zaman dövründə maye azot temperaturunda, buz kristatalları ilə hüceyrə zədələnməsinin qarşısını almaq məqsədi ilə preservativlər əlavə olunmaqla saxlanıla bilər. Baxmayaraq ki, əridilmə zamanı hüceyrələrin hamısı sağ qalmasa da əksəriyyəti sağ qalır və inkişafı bərpa edir.

Tansformasiya Olunmuş Hüceyrələr Kulturada Sonsuz Dərəcədə Çoxala Bilirlər

Fədi hüceyrələri klonlaşdıra bilmək, hüceyrənin davranışını modifikasiya etmək və ya mutantları seçmək üçün bioloqlar çox hallarda hüveyrə kulturasını 50 dəfə bölünmədən daha çox saxlamaq istəyirlər. Belə uzunmüddətli inkişafı, bəzi şişlərdən alınmış hüceyrələr nümayiş etdirirlər. Bundan əlavə, ilkin hüceyrələrin populyasiyasında çox az hüceyrə spontan onkogen mutasiyalara uğrayır və onkogenetik **transformasiyaya** səbəb olur (bax Fəsil 24). Bu hüceyrələrə onkogen transformasiya olunmuş və ya sadəcə olaraq *transformasiya olunmuş* deyilir və onlar sonsuz bölünüb inkişaf edə bilirlər. Qeyri müəyyən həyat dövrünə malik olan hüceyrə kulturası amoral hesab olunur və **hüceyrə xətti** adlanır.

Gəmiricilərin normal hüceyrələrinin ilkin hüceyrə kulturaları çox vaxt hüceyrə xəttinə spontan transformasiya olunurlar. Gəmiricilərin hüceyrəsi kulturada bir neçə nəsil artdıqdan sonra kultura qocalmağa başlayır (Şəkil 4-1b). Bu dövür ərzində, hüceyrələrin əksəriyyətinin inkişafı dayanır, amma çox hallarda sürətlə bölünən transformasiya olunmuş hüceyrələr spontan şəkildə meydana çıxır və kulturada hüceyrə həddən artıq çoxalır. Bu cürə transformasiya olunmuş variantdan alınan hüceyrə xətti, lazım olan qidalandırıcı ilə təmin olunarsa qeyri-müəyyən zaman müddətində inkişaf edəcək. Gəmiricilərin hüceyrələrindən fərql olaraq normal insan hüceyrələri nadir hallarda hüceyrə xəttinə spontan transformasiya olunurlar. İlk yaranan insan hüceyrə xətti, HeLa hüceyrə xətti ilk ilk dəfə 1952-ci ildə uşaqlığın bədxassəli şişlərindən (karsinoma) əldə olunmuşdur. Başqa insan hüceyrə xətləri çox hallarda xərçənglərdən alınırlar və bioloqlar digər hüceyrə xətlərini onkogenləri ekspressya etməklə transformasiya edərək ölümsüz edirlər.

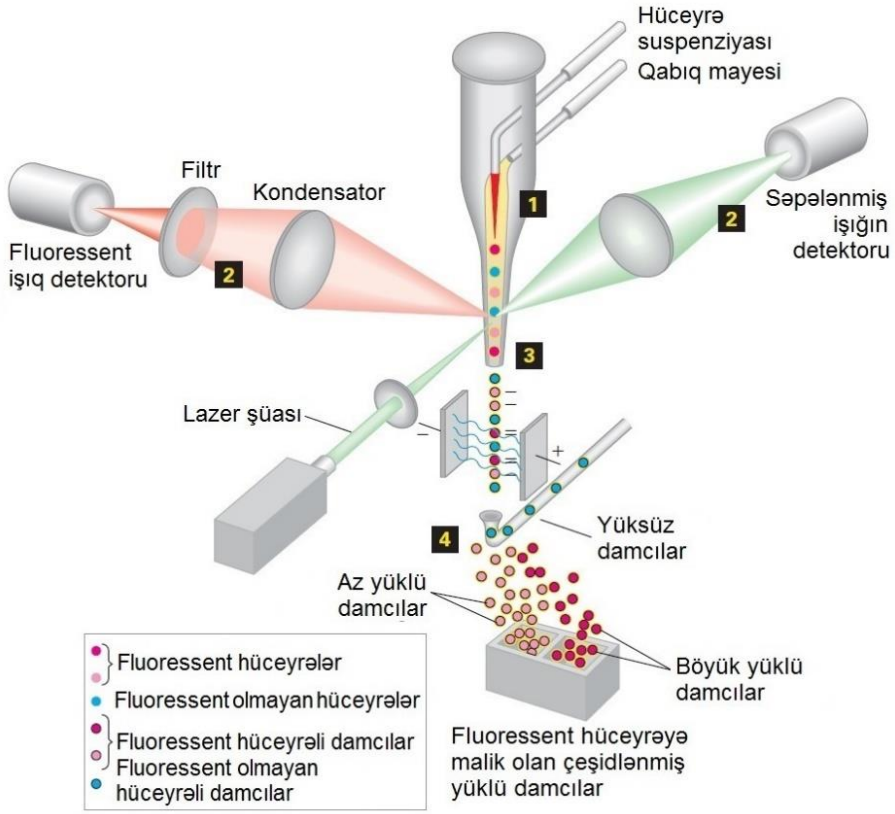
Mənbəyindən asılı olmayaraq, hüceyrələr ölməz hüceyrə xətlərində tez-tez anormal DNT ardıcıllığı olan xromosomlara malik olurlar. Bundan başqa, belə hüceyrələrdə xromosomların sayı adətən onların əmələ gəldiyi normal hüceyrələrdəkinə nisbətən artıq olur və hüceyrələr kulturada bölünməkdə davam eydikcə xromosomların sayı dəyişilir. Diqqətəlayiq bir istisna və təccübləndirici bir inkişaf, xromosom 8 istisna olmaqla, bütün xromosomlar üçün haploid olan, hematopoetik mənşəli insan hüceyrə xəttidir. Diploid hüceyrədə genin iki nüsxəsindən birinin fəalsızlaşması adətən fenotipi əmələ gətirmədiyindən genlərin əksəriyyətinin bir nüsxəsinə malik olan hüceyə xətti genetik analizlər üçün sərfəli olmalıdır və model orqanizmlərdə istifadə olunan genetik skrininqi mümkün edir (bax Fəsil 6). Qeyri normal sayda xromosomlara malik olan hüceyrələr *aneuploid* adlanır.

Axın Sitometriya Müxtəlif Hüceyrə Tiplərini Ayırır

Bəzi hüceyrə tipləri sıxlıqlarına görə kifayət qədər fərqlənirlər, ona görə də onları bu fiziki xassələrinə görə ayırmaq olur. Məsələn, ağ qan üceyrələru (leykositlər) və qırmızı qan hüceyrələru (eritrositlər) çox fərqli sıxlığa malikdirlər, çünki eritrositlərdə nüvə yoxdur, ona görə də, bu hüceyrələri tarazlıq sıxlıq-qradientin sentrifuqalama (Bölmə 4.4-də təsvir olunan) yolu ilə ayırmaq olur. Hüceyrə tiplərinin əksəriyyəti asanlıqla differensasiya edə bilmədiyindən, onları ayırmaq üçün axın sitometriya kimi başqa metodlardan istifadə olunmalıdır.

Mürəkkəb qatışıqda bir hüceyrə tipini ayırmaq üçün, nəzərdə tututlan həmin hüceyrəni işarələmək və sonra çeşidləmək lazımdır. Aşağıda biz görəcəyik ki, hüceyrələrdə fluoressent zülalı ekspressiya etməklə onları işarələmək olar, amma, əgər populyasiyada yalnız bir neçə hüceyrə bu zülalı ekspressiya edirsə o zaman biz onları fluoressent ekspressiya etməyənlərdən necə çeşidləyib ayıracağıq? Hüceyrələr *axın sitometriyada* analiz oluna blər. Bu maşın hüceyrələri axıdaraq lazer şüalarından keçirir və onların səpdiyi işığı və şüalandırdığı (emissiya etdiyi) fluoressensiyanı sayır. Axın sitometriyaya əsaslanan *fluoressensiya ilə-fəallaşan hüceyrə çeşidləyicisi* (*Fluoressence-activated cell sorter - FACS*) həm hüceyrələri analiz edə bilir, həm də bir və ya bir neçə hüceyrəni minlərlə hüceyrələr arasından seçərək ayrı-ayrı kultura qablarına çeşidləyə bilir (Şəkil 4.2). Buna nail olmaq üçün hüceyrələr bufer ilə qarışdırılır, və damçılar yaratmaq üçün vibrasiya etməklə FACS maşının ucluğundan keçməyə məcbur edilir. Hüceyrələrin qatılığı elə nizamlanır ki, yaranan damcıların çoxunda hüceyrə olmur, olanlarda isə yalnız bir hüceyrə olur. Məhz ucluğun önündə hüceyrələrin axını lazer şüasından elə keçir ki, onların mövcud olması və ölçüsü bir detektordan istifadə etməklə səpilən işıqdan yazıla bilir, udulan fluoressent işığın miqdarı isə ikinci fluoressent detektordan istifadə etməklə yazılır. Əgər hüceyrə damcıda mövcuddursa ucluqdan çıxanda damcı mənfi elektrik yükü verəcək. Sonra damcıların axını damçılardakı hüceyrələrdən aşkar olunan fluoressensiyaya mütənasib elektrik sahəsi yaradan iki lövhədən keçir. Bu sahə yüklənmiş damcıları yüklənməmiş damcıların axınından ayrılıb çıxmağa və tyubda toplanmağa məcbur edən qüvvəni yaradır. Tətbiq olunan qüvvənin miqdarı damcılardakı hüceyrələr tərəfindən buraxılan fluoressensiyanın miqdarına mütənasib olduğundan, müxtəlif fluoressensiya səviyyəli hüceyrələr toplana bilər. Başqa hüceyrələrdən çeşidləndikdən sonra, seçilmiş hüceyrələr kulturada artırıla bilir.

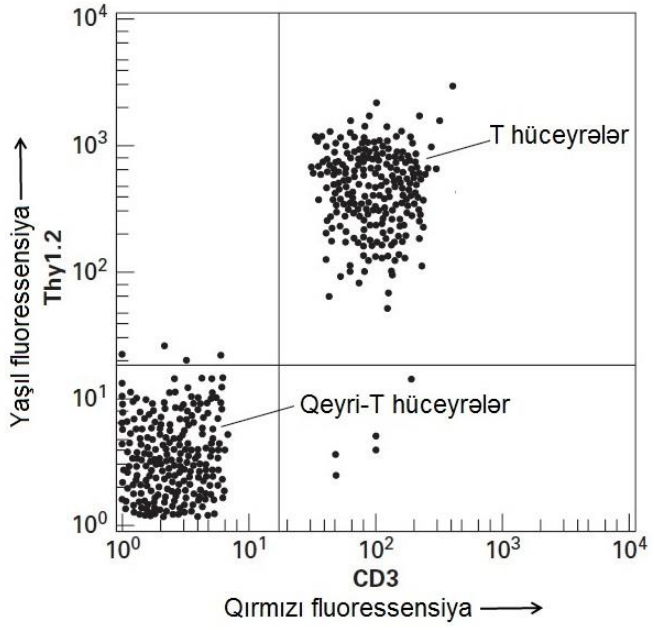
FACS proseduru müxtəlif tipli ağ qan hüceyrələrini təmizləmək üçün çox istifadə olunur, bu hüceyrələrin hər biri öz səthində bir və ya daha artıq fərqli zülalları daşıyırlar və ona görə də bu zülallara spesifik monoklonal anticismlər birləşəcək. Əgər hüceyrə qatışığı hüceyrə-səth zülalına spesifik anticismlə əlaqəli fluoressent boya ilə inkubasiya olunarsa yalnız arzu olunan hüceyrələr fluoressent olacaqlar. Məsələn, immun sisteminin yalnız T hüceyrələrinin səthində həm CD3 həm də Thy1.2 zülalları vardır. Bu səth zülallarının mövcud olması T hüceyrələrə başqa tip qan hüceyrələrindən və ya dalaq hüceyrələrindən asanlıqla ayrılmaq imkanı verir (Şəkil 4-3).



ŞƏKİL 4-2 Fluoressensiya ilə-fəallaşan hüceyrə çeşidləyicisi (Fluorescence-activated cell sorter - FACS) fluoressent reagentlə müxtəlif səviyyədə fluoressensiyalı hüceyrələri ayırır. Pillə 1: Nişanlanmış hüceyrələrin qatılaşdırılmış suspemziyası buferlə elə qarışdırılır ki, hüceyrələr lazer işığı şüalarından bir fayl ötürülür. Pillə 2: Həm buraxılmış fluoressent işıq həm də hər bir hüceyrə tərəfindən səpilən işıq ölçülür, səpilən işığın ölçmələrindən hüceyrələrin ölçüsü və forması təyin oluna bilir. Pillə 3: Sonra suspenziya ucluqdan (nozzle) keçməyə məcbur edilir, burada o tərkibində yalnız bir hüceyrəyə malik olan çox xırda damcıları əmələ gətirir. Tərkibində bir hüceyrə olan hər bir damcı borucuq ucluğunda yaranarkən tərkibində bir hüceyrə olan damcı əvvəlki ölçmələrdə təyin edilmiş hüceyrənin fluoressensiyasına mütənasib mənfi elektrik yükü verir. Pillə 4: Damcılar indi elektrik sahəsindən elə keçir ki, yükə malik olamayan damcılar atılır, amma müxtəlif elektrik yükünə malik olanlar ayrılaraq toplanır. Hər bir damcının ayrılb toplanması yalnız millisaniyə vaxt aldığından bir saat ərzində 10 milliona qədər böyük miqdarda hüceyrə maşından keçə bilər.

Axın sitometriyanın başqa istifadəsində hüceyrənin DNT və RNT tərkibinin ölçülməsi və onun əsas formasının və ölçüsünün təyin edilməsi aparılır. FACS hüceyrənin ölçüsünün (səpilən işığın miqdarına görə) və eyni zamanda onun malik olduğu DNT-nin miqdarının (DNT-birləşdirən boyanın buraxdığı fluores-sensiyanın miqdarına görə) ölçülmələrinə imkan verir. Fərdi hüceyrələrin DNT tərkibinin ölçülməsi hüceyrələr hüceyrə tsiklində proqress edərkən DNT replikasiyasını izləmək üçün istifadə olunur (bax Fəsil 19).

Spesifik hüceyrə tiplərinin ayrılması üçün alternativ metod, spesifik səth molekullarının monoklonal anticismlərinə birləşmiş kiçik maqnit zərrəciklərdən istifadə edilməsidir. Məsələn, T hüceyrələrini ayırmaq üçün maqnit zərrəciklər, CD3 və ya Thy1.2 kimi səth zülallarına spesifik olan monoklonal anticismlərlə örtülür. Yalnız bu zülallara malik olan hüceyrələr zərrəciklərə yapışacaq və preparatdan sınaq tyubunun səthindəki kiçik maqnitə yapışmaqla ayrıla biləcək.



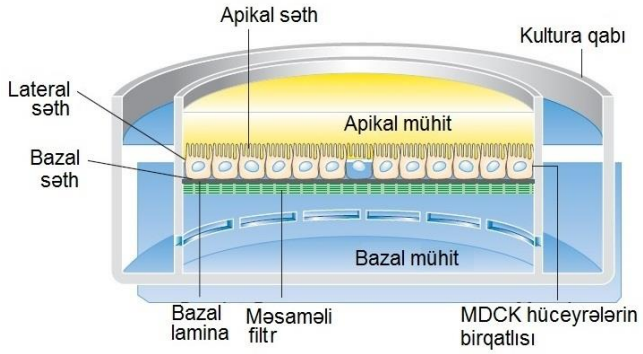
EKSPERİMENTAL ŞƏKIL 4-3 İki hüceyrə səthi zülalı ilə fluoressent yarlıklanmış anticismlərlə birləşən T hüceyrələr digər ağ qan hüceyrələrindən FACS ilə ayrılırlar. Siçandan alınan dalağ hüceyrələri, hüceyrə sthi CD3 reseptor zülala-spesfik qırmızı fluoressent monoklonal anticismlə və ikinci hüceyrıə səthi Thy1.2 zülala-spesfik yaşıl fluoressent monoklonl anticismlə işlənilmişdir. Hüceyrələr FACS maşından keçdiyindən hər bir hüceyrə tipi tərəfindən buraxılan qırmızı və yaşıl fluoressensiyanın intensivliyi yazılmışdır. Hər bir nöqtə bir hüceyrəni göstərir. Minlərlə dalağ hüceyrəlıərində yaşıl fluoressensiyanın bu qrafikinə (şaquli ox) qarşı qırmızı fluoressensiyaya (üfiqi ox) göstərir ki, onların təxminən yarısı – T hüceyrələr həm CD3 həm də Thy1.2 zülalları hüceyrə səthində ekspressiya edirlər (yuxarı sağ kvadrat). Aşağı fluoressensiya nümayiş etdirən qalan hüceyrələr (aşağı sol kvadrat), bu zülalları yalnız fon səviyyəsində ekspressiya edirlər və başqa tip ağ qan hüceyrələridirlər. Qeyd edək ki, hər iki oxda loqarifmik miqyasdır. [Hörmətlə, Chengcheng Zhangdan, Whitehead İnstitute.]

İki-Ölçülü və Üç-Ölçülü Kulturada Hüceyrələrin Inkişafı In Vivo Mühiti Əks Etdirir

Plastik və ya şüşə səthdə bitən hüceyrələrdən istifadə etməklə çox şey öyrənilsə də, bu səthlər hüceyrələrin normal toxuma

mühitindən çox uzadır. Fəsil 20-də detalları ilə verilmiş, çox hüceyrə tipləri yalnız başqa hüceyrələrlə çox yaxın əlaqəli olduqda fəaliyyət göstərə bilirlət. Əsas nümunə, orqanların daxili və xarici səthlərini örtən **epitelilər** (təkdə **epiteli**) adlanan epitelial toxumanın vərəq-şəkilli qatlarıdır. Adətən, epitelial hüceyrələrin fərqli səthləri ***apikal*** (yuxarı), ***bazal*** (aşağı) və ***lateral*** (yan) səthləri vardır (bax Şəkil 20-11). Bazal səth adətən aşağıda yerləşən, *bazal lamina* adlanan, tərkibi və funksiyası Bölmə 20.3-də müzakirə olunan hüceyrəxarici matrisa ilə əlaqə yaradır. Epiteli hüceyrələri çox hallarda xüsusi sinif molekulların epitelial təbəqəni keçərək daşınmasında fəaliyyət göstərirlər, məsələn, bağırsağın epitelial qatı qidanı apikal səthdən keçərək hüceyrə daxilinə və bazolateral səthdən keçərək qan axını istiqamətində hüceyrə xaricinə daşıyır. Epiteli hüceyrələri plastik və ya şüşə qabda bitərkən bu funksiyanı asanlıqla həyata keçirə bilmirlər. Ona görə də, bazal lamina kimi fəaliyyət göstərən məsaməli səthə malik olan xüsusi qablar dizayn olunmuşdur ki, epiteli hüceyrələri bura yapışaraq yekcins iki-ölçülü təbəqəni yaradırlar (Şəkil 4-4). Çox istifadə olunan, itin böyrəginin epitelisindən alınmış kultura hüceyrə xətti *Madin-Darby köpək böyrəyi* (*MDCK – Madin-Darbi canine kidney*) *heceyrələri* adlanır və tez-tez hallarda, epitelial təbəqəsinin fəaliyyətinin və formalaşmasının tədqiqində istifadə olunur.

Amma, həta iki-ölçülü təbəqə də, çox vaxt hüceyrələrə onların normal mühitdəki davranışını tam oxşatmağa imkan vermir. Hüceyrələri üç ölçüdə çoxaltmaq üçün hüceyrəxarici matrisanı komponentləri ilə birlikdə süzgəcdən keçirmək metodu artıq inkişaf etdirilmişdir (20-ci fəsildə müzakirə olunur). Əgər MDCK hüceyrələr müvafiq şəraitdə kultura olunarsa, onlar boruşəkilli təbəqə yaradaraq özlərini boruvari orqanlara və ya ifrazat vəzi axarına bənzədəcəklər. Bu üç-ölçülü quruluşlarda, epitelial təbəqənin yuxarı (apikal) tərəfi lümenə uzandığı halda, hər bir hüceyrənin bazal tərəfi hüceyrəxarici matrisa ilə əlaqədə olur (Şəkil 4-5).



ŞƏKİL 4-4 Xüsusi qablarda inkişaf etmiş Madin-Darby köpək böyrəyi (MDCK) heceyrələri epitelial hüceyrələri öyrənmək üçün əhəmiyyətli eksperimental sistemdir. MDCK hüceyrələr, bir tərəfində kollagenlə və bazal laminanın başqa komponentləri ilə örtülmüş məsaməli membran filtirlərdə bitərkən qütbləşmiş epitelini yaradırlar. Burada göstərilmiş xüsusi kultura qabından istifadə etməklə, filtrin hər iki tərəfində mühit (təkqatlının apikal və bazal tərəfləri) eksperimental yolla manipulyasiya (idarə) oluna bilər və molekulların bu qatdan keçərək hərəkəti göstərilə bilər. Hüceyrələri bir-biri ilə birləşdirən bir sıra hüceyrə qovşaqları çoxalma mühitində yalnız kifayət qədər Ca^{2+} olduqda yaranırlar.

Əgər biz epiteli borucuqlarını kulturada yetişdirə bilsəydik, xəstəyə transplantasiya oluna bilən tam orqanı yarada bilərdikmi? Bio-tibbi mühəndisliyin son inkişafları bunu etmək üçün ilkin olaraq eksperimental heyvanlarda perspektiv strategiyaları yaradır. Bu yanaşmanın bir nümunəsində 3-D printer əvəz edici qulağın düzəldilməsi üçün istifadə edilmişdir. Əvvəlcə qulağın dəqiq kompüter təsviri yaradılmışdır. Bu təsvir, qulağın dəqiq formasını yaratmaq üçün bioloji parçalanan koməkçi materiallarla birlikdə hüceyrəxarici matrisanın müvafiq materiallarına malik olan yumuşaq matrisanı 3-D printerin proqramlaşdırılmasında istifadə edilmişdir. Bu matrisa istər kulturada istərsə də transplantasiyadan sonra dəri hüceyrələrinin artmasına kömək edir, beləliklə sonda sintetik orqan cərrahi yolla canlı heyvana bərkidilə bilir. 3D printeri istifadəsinin başqa bir yanaşması matrisanın toplanması və ona müvafiq hüceyrələrin əkilməsidir. Bu texnologiyanın sevindirici və iddialı məqsədi müxtəlif tip hüceyrələrə malik olan sintetik orqanların yaradılmasıdır, bir gün gələcək ki, mürəkkəb üç-ölçülü orqanı yaratmaq üçün çoxsaylı təbəqələrin hər birinin müvafiq matrisa və hüceyrə ilə çap olunması, xəstədə qüsurlu orqanın əvəz olunması üçün istifadə ediləcək. Bir çox maneələr hələ də aradan qaldırılmalıdır, amma xəstələrdən sütun hüceyrələrini ayırmaq və sonra da kulturada induksiya etməyin mümkün olması qabliyyəti (21-ci fəsildə təsvir olunur) immunoloji rəddolunmanın əsas maneəsini aradan qaldıracaq və yəqin ki, sintetik orqanlar üçün hüceyrələrin təmin edilməsinin əsası olacaq.

Hibridomalar Zəngin Monoklonal Anticismləri Yaradır

Kultura olunan hüceyrələr hüceyrə funksiyasının öyrənilməsində tədqiqat modeli kimi istifadə olmaqla yanaşı, onlar xüsusi zülalların sintezi üçün "fabrik"ə də çevrilə bilərlər. Məsələn, xüsusi kultura olunmuş hüceyrələr monoklonal anticismlərin alınmasında istifadə oluna bilər, bu da bioloji tədqiqatların çox aspektlərində geniş istifadə olunan eksperimental alətdir. Bizim sonrakı fəsillərdə müzakirə edəcəyimiz kimi, onlar təbabətdə diaqnostik və müalicə məqsədi ilə getdikcə daha artıq dərəcədə istifadə olunurlar.

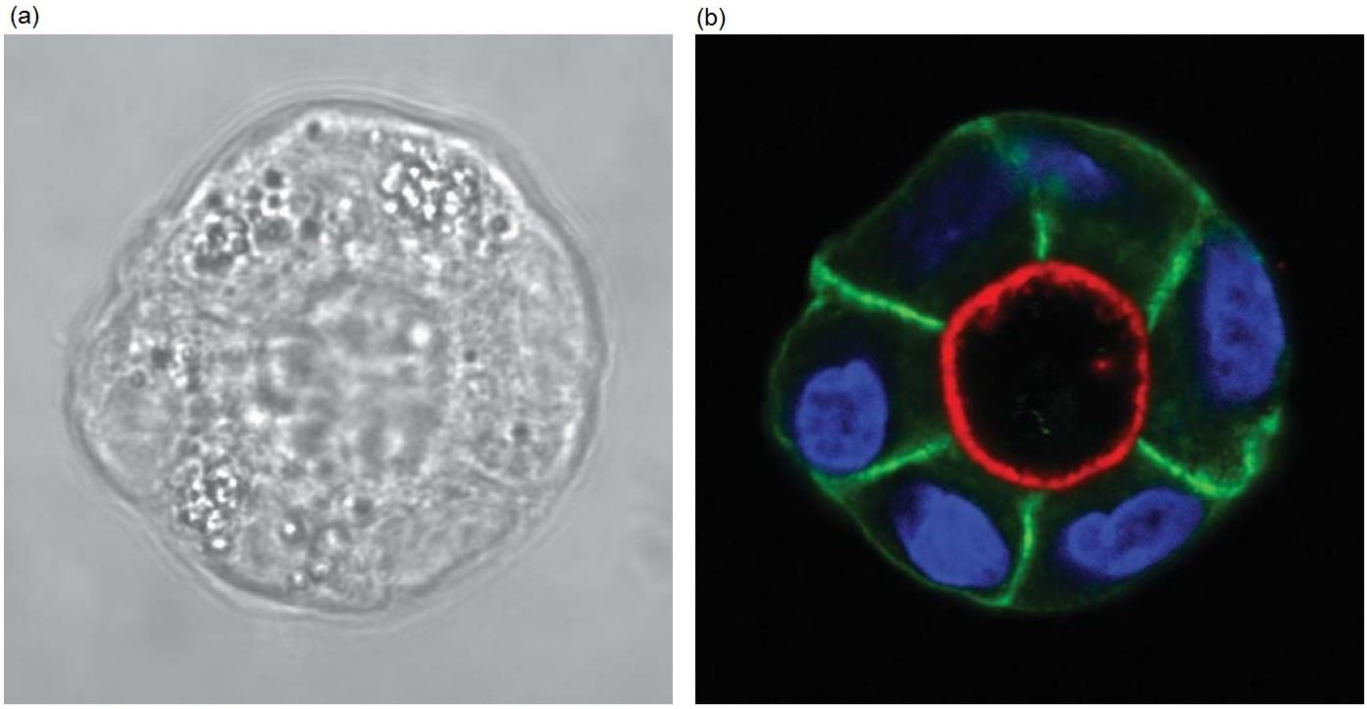
Monoklonal anticismləri yaratmağın çətinliyini anlamaq üçün, biz məməlilərin anticismlıəri necə istehsal etdiklərini qısaca nəzərdən keçirməliyik, bu Fəsil 23-də ətraflı verilmişdir. Xatırladaq ki, anticismlər ağ qan hüceyrələri tərəfindən ifraz olunan zülallar olub yüksək afinliklə öz antigenlərinə birləşirlər (bax Şəkil 3-19). Məməlilərdə hər bir normal anticism-istehsal edən B limfosit yalnız, antigen molekulunda olan xüsusi **determinanta** və ya **epitopa** birləşə bilən bir tip anticism istehsal etmək qabliyyətinə malikdir. Ümumiyyətlə, epitop antigenin kiçik bir ryonudur, məsələn, yalnız çox az sayda amin turşusundan təşkil olunur. Əgər heyvana antigen inyeksiya olunarsa, anticismləri istehsal edən B limfositlər bu antigeni tanıyaraq artıb anticism ifraz etmık üçün stimullaşırlar. Antigenlə-fəallaşan hər bir B limfosit dalağda və ya limfa düyünlərində hüceyrənin klonunu yaradır və klonun hər bir hüceyrəsi eyni (identik) anticismi istehsal edir, bu *monoklonal anticismdir*. Təbii antigenlərin əksəriyyəti bir neçə epitopa malik olduğundan heyvanın antigenə məruz qoyulması adətən çoxsaylı müxtəlif B-limfosit klonlarının əmələ gəlməsinə səbəb olur və

bunların hər biri fərqli spesifik anticismləri istehsal edirlər. Anticismlərin çoxsaylı müxtəlif B-limfosit klonlardan əmələ gəlmiş qatışığı eyni antigendə müxtəlif epitoları tanıyırlar, və bunlara *poliklonal* deyilir. Bu cürə poliklonal anticismlər qanda dövr edir və qrup şəkilində ayrıla bilirlər.

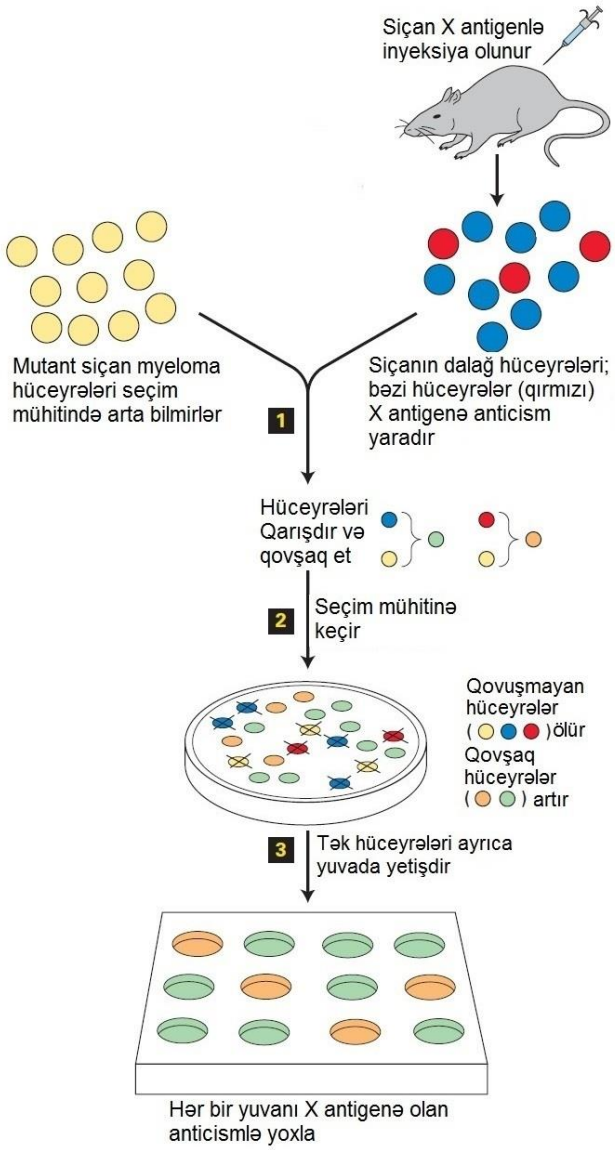
Poliklonal anticismlər çox faydalı olsalar da, monoklonal anticismlər çoxsaylı müxtəlif tipli eksperimentlər üçün və tibbi istifadə üçün, xüsusən də, zülalın yalnız bir hissəsinə birləşən reagent, məsələn, hüceyrə səthi reseptoru üçün liqandla rəqabətdə olan reagent üçün lazım olduqda daha çox münasibdir. Təəssüf ki, istənilən bir tip monokllonal anticisəmin qandan biokimyəvi yolla təmizlənməsi iki əsas səbəbə görə mümkün deyil: verilmiş istəniləın anticismin qatılığı kifayət qədər aşağıdır, və bütün anticismlər eyni molekulyar arxitekturaya malikdirlər (bax Şəkil 3-19).

Monoklonal anticismləri istehsal etmək və sonra da təmizləmək üçün hər bir kəs ilkin olaraq müvafiq B-limfosit klonunu yaradıb artırmağı bacarmalıdır. Amma, B-limfositlərin ilkin kulturası monoklonal anticismlərin istehsalı üçün məhdud istifadə olunur çünki onlar məhdud həyat dövrünə malikdirlər. Beləiklə, monoklonal anticismlərin istehsalında birinci mərhələ anticism istehsal edən ölümsüz hüceyrənin yaradılmasıdır (Şəkil 4-6). Ölmsüzlik, immunizasiya olunmuş heyvanın normal B-limfositinin transformasiya olunmuş, *myeloma hüceyrələri* adlandırılan, amma özləri anticismləri (bax Şəkil 3-19) sintez edə bilməyən ölməz limfositlərlə qovşaq olunması nəticəsində əldə olunur. Müəyyən virus qlikozülalları ilə və ya kimyəvi polietilenqlikol ilə təsir etmə iki hüceyrənin plazma membranının qovuşmasına kömək edir, onların sitozolunun və orqanoidlərinin bir-birinə qarışmasına imkan verir. Qovuşmuş bəzi hüceyrələr bölünməyə uğrayırlar və tədricən onların nüvələri də qovuşur və hər iki "valideyindən" alınmış xromosomlara malik olan bir nüvəli həyat qabliyyətli *hibrid hüceyrəni* əmələ gətirirlər. Genetik cəhətdən müxtəlif olan iki hüceyrənin qovuşması yeni xüsusiyyətlərə malik olan hibrid hüceyrəni əmələ gətirə bilir. Məsələn, miyeloma hüceyrəsinin siçanın və ya siçovulun dalağının anticism-istehsal edən normal hüceyrəsi ilə qovuşması **hibridoma** adlandırılan klona proliferasiya edən hibridi əmələ gətirir. Myeloma hüceyrələri kimi, hibridoma hüceyrələri də sürətlə artır və ölməzdirlər. Hər bir hibridoma özünün B-limfosit valideyni ilə kodlaşdırılan monoklonal anticismi istehsal edir.

Monoklonal anticismin istehsalında bu prosesin ikinci mərhələsi hibridoma hüceyrələrini qovuşmamış valideyin hüceyrələrindən və eyni tipdən olan başqa hüceyrə ilə hibridləşmiş hüceyrələrdən ayırmaq və ya seçmək oldu. Adətən bu seçmə, hüceyrələrin qatışığını, *seçmə mühiti* adlanan xüsusi kultura mühitində inkubasiya etməklə həyata keçirilir, bu isə onların yeni xüsusiyyətlərinə görə yalnız hibridoma hüceyrələrinin inkişafına imkan verir. Qovuşma üçün istifadə olunan myeloma hüceyrələri, metabolik yolları blok edən mutasiyanı daşıyırlar, ona görə də onlara letal olan seçim mühiti istifadə oluna bilər, amma onların mutasiyaya malik olamayan limfosit qovuşma valideyinləri üçün oluna bilməz. Ölümsüz hibrid hüceyrələrdə, limfositlərdən gələn funksional gen itmiş gen məhsulunu təmin edir.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 4-5 MDCK hüceyrələr kulturada kistaları əmələ gətirirlər. (a) Təmin olunmuş hüceyrəxarici matrisada bitən hüceyrələr, polyarlaşaraq birqat hüceyrələrdən ibarət olan, ortasında sista adlanan lümen olan sferik hüceyrə qruplarını əmələ gətirir. (b) Apikal (qırmızı) və bazo-lateral membranlarda (yaşıl) tapılmış zülalların yerləşməsini (lokalizasiyasını) yoxlamaqla görmək olar ki, bu hüceyrələr tam polyarlaşmışlar, onların apikal tərəfi lümenə baxaraq, təşkil olunmaları özlərinin törəndikləri böyrək borucuqlarındakı kimidir. Nüvə DNT-si mavi rəngdə boyanmışdır. [Institute of Cancer Sciences/CRUK Beatson Institute, University of Glasgow, Garscube Estate, Switchback Road.]



ŞƏKİL 4-6 Spesifik zülalların monoklonal anticismlərini istehsal etmək üçün hibridomaların alınmasında hüceyrə qovşaqlarının və seçilməsinin istifadə olunması. Pillə 1: Timidinkinazalara malik olamadığına görə xüsusi şəraitdə purinləri istehsal edə bilməyən ölümsüz myeloma hüceyrələri X antigeni ilə immunizasiya olunmuş heyvandan alınan, anticism istehsal edən normal dalağ hüceyrələri ilə qovşaq edildi. Pillə 2: Xüsusi selektiv mühitdə kultura olunarkən qovuşmamış və özü ilə qovuşmuş hüceyrələr inkişaf etmir və mutant myeloma hüceyrələr də inkişaf etmir, çünki selektiv mühitdə purinlər yoxdur və dalağ hüceyrələri də məhdud həyat tsiklinə malik olduğundan inkişaf etmirlər. Beləliklə, yalnız myeloma hüceyrələrindən və dalağ hüceyrələrindən qovuşma yolu ilə əmələ gələn qovşaq olunmuş hüceyrələr xüsusi mühitdə sağ qalırlar və hibridoma adlanan klonlara proliferasiya edirlər. Hər bir hibridoma tək bir anticismi istehsal edir. Pillə 3: Fərdi klonların sınaqdan keçirilməsi X antigenini tanıyanlrı identifikasiya edir. Nəzərdə tutulan anticismi istehsal edən hibridoma identifikasiya olunduqdan sonra klon həmin anticismi böyük miqdarda istehsal etmək üçün kultura oluna bilər.

Qovuşmada istifadə olunan limfositlər ölümsüzləşməmiş olduğundan seçim mühitində inkişaf etməyəcək. Beləliklə yalnız hibridoma hüceyrələr seçilmə mühütində sürətlə proliferasiya edəcəklər və ona görə də onları ilkin hüceyrə qatışığından tez bir şəkildə ayırmaq mümkün olacaq. Nəhayət, hər bir seçilmiş hibridoma klonu sonra nəzərdə tutulmuş anticismə görə sınaqdan keçirilir, bu anticismi istehsal edən istənilən klon böyük kulturada yetişdirilir və ondan kifayət qədər böyük miqdarda təmiz monoklonal anticism alına bilər.

Monoklonal anticismlər xüsusi tədqiqat aləti kimi çox əhəmiyyətli reagentə çevrilə bilər. Adətən onlar, zülalların mürəkkəb qatışıqlardan ayrılmasında və təmizlənməsində affin xromotoqrafiya ilə istifadə olunur (bax Şəkil 3-38). Bizim sonra bu fəsildə müzakirə edəcəyimiz kimi, onlar həmçinin xüsusi zülalın hüceyrə daxilində birləşməsi və təyin edilməsi üçün immunfluoressensiya mikroskopunda da istifadə olunur. Onlar həmçinin, immunoblottinqdən istifadə edərək spesifik zülalların hüceyrə fraksiyalarında aşkar olunmasında istifadə oluna bilər (bax Şəkil 3-39). Monoklonal anticimlıar təbabətdə də çox əhəmiyyətli diaqnoz və müalicə alətinə çevrilmişdir; məsələn, bakteeial patogenlər tərəfindən ifraz olunan toksinlərə birləşən və onları inaktivasiya edən monoklonal anticismlər xəstəliklərin müalicəsində istifadə olunur. Başqa monoklonal anticismlər müəyyən tip şiş hüceyrələrinin ekspressiya etdikləri hüceyrə-səthi zülallarına spesifikdirlər. Bu cürə şişlərə-qarşı (anti-şiş) anticismlərin bir neçəsi xərçəngin müalicəsində, o cümlədən bəzi süd vəzi xərçəngində həddən artıq-ekspressiya olunan HER2 reseptorun mutant formasına qarşı olan monoklonal anticismlər geniş istifadə olunur.

Geniş Müxtəliflikdə Hüceyrə Biologiyası Prosesləri Kultura Olunan Hüceyrələrlə Öyrəlinə Bilər

Bu fəsilin girişində müzakirə olunduğu kimi, heyvan hüceyrələrinin kulturada öyrənilməsi hüceyrələrin intakt heyvanda öyrənilməsindən çox asandır, qismən ona gtörə ki, onlar asanlıqla müxtəluf manipulyasiyalara hədəf oluna bilirlər. Kultura olunan hüceyrələr fundamental proseslərin izah olunması üçün xüsusi əhəmiyyət kəsb edir. Bioloji prosesləri anlamağın bir yolu onun hüceyrə daxilindəki spesifik tərkib hissəsinə müdaxilə etmək və alınan nəticəni qiymətləndirməkdir, bu yanaşma maşının müəyyən hissələrini çxarmaqla onun necə işləməsinə baxaraq nəyin səhv olduğunu axtarmağa bənzəyir. Bəzi hallarda spesifik hüceyrə komponentlərində genetik qüsurlarla bağlı olan insan xəstəlikləri genetik qüsura malik olan xəstədən alınmış kultura olunan hüceyrə ilə analiz oluna bilər. Məsələn, hiperxolesterolemiya ilə nəticələnən genetik qüsurlu, qanında yüksək miqdarda xolesterin olan və infarkt və ya insult ilə nəticələnəın xəstədən alınmış kultura olunan hüceyrə ilə analiz reseptor-vasitəsilə endositozun əsas mərhələlərini izah etmək üçün kritik əhəmiyyət kəsb etmişdir (bax Fəsil 14). Təbii meydana gələn genetik yaralanmalara əsaslanmaqdan başqa biz xüsusi komponentlərin ekspressiyasına müdaxilə etmək üçün kultura olunan hüceyrələri manipulyasiya edə bilərik. Bizim Fəsil 6-da grəcəyimiz kimi, kultura olunan hüceyrədə müvafig mRNT-ni selektiv "nok-daun" etməklə spesifik zülalın ekspressiyasını azaltmaq və bu dəyişikliyin hüceyrədə xüsusi bir prosesə təsirini qiymətləndirmək mümkündür. Fəsil 6 son zamanlar yaradılıb inkişaf etdirilmiş, kultura olunan hüceyrənin genomunda spesifik genləri fəalsızlaşdırmağa imkan verən və beləliklə spesifik mRNT-lərin və zülalların tamamilə itirilməsinin hüceyrə funksiyasına necə təsir etməsini qiymətləndirməyə imkan verən metodu da təsvir edir.

Hüceyrə Biologiyası Tədqiqatlarında Çox İstifadə Olunan Dərmanlar

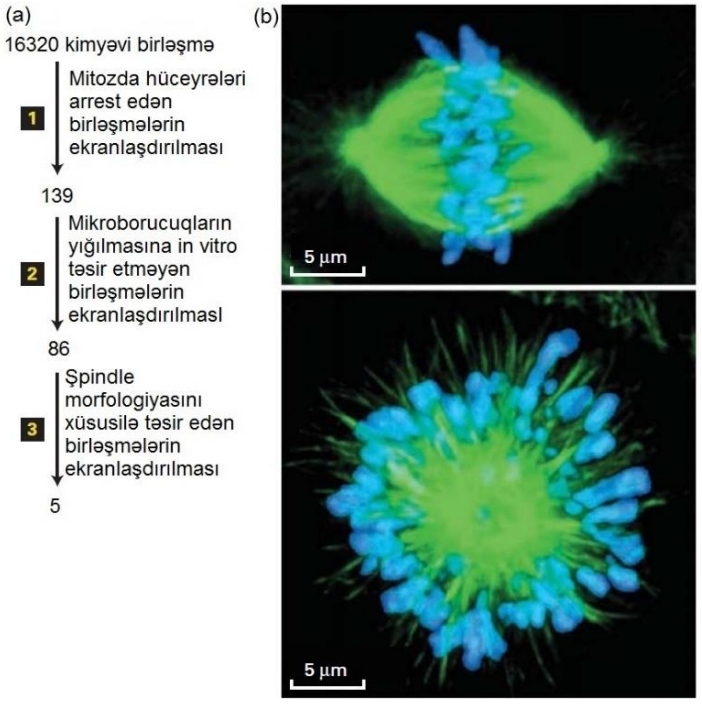
Bioloji prosesləri analiz etmək üçün başqa bir güclü metod xüsusi hüceyrə komponentlərinə birləşən və onu fəallaşdıran və ya ingibirləşdirən dərmanla hüceyrələrə təsir etməkdir. Bu bölmədə biz bu məqsədlə çox istifadə olunan bəzi dərmanları və yeni istifadə olunan dərmanların təsir etdiyi spesifik proseslərin necə inkişaf etdiyini müzakirə edirik.

Təbii şəkildə meydana gələn dərmanlar əsirlər boyu istifadə olunmuşdur, amma onların necə işlədiyi çox zaman məlum deyildi. Məsələn, çəmən zəfəranının ekstraktı, oynaqlarda iltihab nəticəsiundə əmələ gələn ağrılı xəstəlik podoqra artritlərinə qarşı istifadə olunmuşdur. Bu gün biz bilirik ki, bu ekstraktda mikroborucuqları depolimerləşdirən və ağ qan hüceyrələrinin iltihab olan mərkəzlərə hərəkət etməsi qabliyyətinə təsir edən kolxisin vardır (bax Fəsil 18). Aleksandr Fleminq aşkar etmişdir ki, bəzi göbələklərin ifrazat komponentləri bakteriyaları qırır (antibiotiklər), nəticədə pennisillin aşkar edilmişdir. Yalnız sonralar məlum olmuşdur ki, penisillin bəzi bakterialarda hüceyrə divarının toplanmasını dayandırmaqla bakterial hecyrə bölünməsini ingibirləşdirir.

Buna bənzər çox kəşflər, hüceyrələrdə spesifik və əhəmiyyətli prosesləri ingibirləşdirən geniş çeşiddə dərmanların aşkar olunması ilə nəticələndi. Əksər hallarda, tədqiqatçılar tədricən dərmanların molekulyar hədəfini tapmaq qabliyyəyinə malik oldular. Məsələn, çox antibiotik dərmanlar vardır ki, onlar prokariotlarda zülal sintezinin aspektlərinə təsir edirlər. Geniş müxtəlifliyə malik olan hüceyrə proseslərinə təsir edən daha çox istifadə olunan bəzi dərmanların seçilməsi Cədvəl 4-1-də göstərilmişdir və onlar ingibirləşdirdikləri prosesə görə qruplaşdırılmışdırlar.

Yeni dərman necə aşkar edilir? Geniş istifadə olunan bir yanaşma spesifik prosesləri ingibirləşdirən on minlərdən yüz minlərə qədər müxtəlif kimyəvi birləşmələrdən təşkil olunmuş *kimyəvi kitabxananın* axtarışıdır. Kimyəvi kitabxanaların yüksək imkanlı mikroskopik metodlarla birlikdə skrininqi hazırkı dövürdə dərmanların aşkar edilməsində əsas yoldur. Bu cürə yanaşmanın necə işlədiyini təsvir etmək üçün biz burada yalnız bir nümunə üzərində dayanacağıq.

Bizim nümunəmizdə (Şəkil 4-7a), tədqiqatçılar ikiləşmiş xromosomların mitoz şpindeli adlanan mikroborucuq-əsaslı mexanizmlə dəqiq seqreqasiya etdiyi (Fəsil 18-də müzakirə olunan) proses zamanı mitozu ingibirləşdirən komponenti tapmaq istəyirdilər. Həmçinin məlum idi ki, əgər şpindel toplanması təhlükədədirsə hüceyrələr mitozda arest olunur. Ona görə də, hüceyrəni mitozda arrest edən birləşmələri tapmaq üçün istifadə olunan ekran ilk dəfə avtomatlaşdırılmış robot metodunu istifadə etdi. Mitozun namizəd birləşmələr tərəfindən ingibirləşməsindən sonra, onların mikroborucuqların toplanmasına təsir etməsini öyrənməyi araşdırıldı. Mikroborucuq tolanmasının ingibirləşməsi maraq daxilində olmadığından, qalan namizəd birləşmələrin şpindelin quruluşuna təsiri mikroborucuqların əsas zülalı tubulinə olan anticismlərdən istifadə edərək immunofluoressensiya mikroskopiyası yolu ilə təyin edilmişdir. 16000-dən çox birləşmə ekranlaşdırılmışdır və anormal şpindelə malik olan hüceyrə ilə nəticələnən birləşmə identifikasiya olunmuşdur, onlar iki aster əvəzinə bir asterə malik olmuşlar, bu da bir-asterli (mono-astral array) adlanan düzülüşün yaranması ilə nəticələnmişdir (Şəkil 4-7b). İndi *monastrol* adlanan bu dərman, kinesin-5 adlanan mikroborucuq əsaslı motor zülalı ingibirləşdirərərk şpindelin toplanmasına müdaxilə edir. (Mitoz şpindelinin daha dərin detallarına görə Fəsil 18-ə bax). Monoasterolun törəmələri indi müəyyən xərçəng xəstəliklərinin müalicəsi üçün şişə-qarşı agentlər kimi sınaqdan keçirilir.



Şəkil 4-7 Xüsusi bioloji proseslərə təsir edən dərmanların ekranlaşdırılması. (a) Bu nümunədə, 16320 müxtəlif kimyəvi maddənin kitabxanası, mitozun ingibitoru kimi çoxsaylı ekranlaşdırmalara istifadə olunmuşdur. Belə ingibitorun hüceyrəni hüceyrə tsiklinin mitoz mərhələsində arest etməsi gözlənildiyindən, mitotik hüceyrələr üçün ilkin ekranlaşdırma (pillə 1) bu kimyəvi maddələrin istənilən hər-hansı birinin mitoza gedən hüceyrələrdə marker səviyyəsini yüksəldə bilməsini tapmaq olmuşdur və bu 139 namizədi aşkar etmişdir. Mikroborucuqlar mitoz şpindelinin quruluşunu əmələ gətirir, tədqiqatçılar isə mikroborucuqları hədəf edən yeni dərmanlarla maraqlanmırdılar, beləliklə ikinci ekranlaşdırmada (pillə 2) onlar mikroborucuqların toplanmasına 139 birləşmənin təsirini sınaqdan keçirdilər, bu sınaq 53 namizədin tapılması ilə nəticələndi. Üçüncü ekranlaşdırmada (pillə 3) tubulinə (mikroborucuqların əsas subvahidi) olan anticismlə immunofluoressensiya mikroskopiyası DNT rənglənməsi ilə birlikdə şpindelin quruluşunu dağıdan birləşmələri tapmaq üçün istifadə olundu. (b) Tubulin (yaşıl) və DNT-nin (mavi) lokalizasiyası təsir edilməmiş mitoz şpindelində (*yuxarıda*) və hazırda monastrol adlanan tapılmış bir birləşmə ilə təsir edilən mitoz şpindelində göstərilmişdir. Fəsil 18-də müzakirə olunduğu kimi, monastrol mitoz şpindelində qütbləri ayırmaq üçün tələb olunan kinezin-5 adlanan mikroborucuq-əsaslı motoru ingibirləşdirir. Kinezin-5 ingibirləşərkən iki qütb birləşmiş vəziyyətdə qalır və bir qütbli şpindeli əmələ gətirir. [(b) hissəsi T.U. Mayer et al., *Science* **286**:971-974-dən.]

Cədvəl 4-1 Hüceyrə Biologiyası Tədqiqatlarında Istidaə Olunan Seçilmiş Dərmanlar

DNT replikasiyasının ingibitoru	Afidikolin (eukariot DNT polimerazanın ingibitoru); kamptotesin, etoposid (eukariotik topoizomerazanın ingibitorları)
Transkripsiyanın ingibitoru	α-Amanitin (eukariot RNT polimeraza II ingibitoru); aktinomisin D, 5,6-Dixloro-1-β-D-ribofuranozilbenzimidazole (DRB) (eukariot transkripsiyanın elonqasiyası ingibitoru), rifampsin (bakterial RNT polimerazanın ingibitoru); tiolutin (bakterial və maya RNT polimerazanın ingibitoru)
Zülal sintezinin ingibitorları - əsas zülal istehsalını blok edir; uzunmüddətli təsirdəın sonra toksik olur.	Tsikloheksimid, anisomisin (eukariotlarda translyasiyanın ingibitoru); genetisin/ G418, hiqromisin, puromisin (eukariotlarda və bakteriyalarda translyasiyanın ingibitoru); xloramfenikol (bakteriyalarda və mitoxondridə translyasiyanın ingibitoru); tetrasiklin (bakteriyalarda translyasiyanın ingibitoru).
Proteaza ingibitorları – zülal dağılmasının blok edir.	MG-132, laktasistin (proteasom ingibitorları); E-64, leupeptin (serin və/və ya sistein proteaza ingibitoru); fenilmetilsulfonilflorid (PMSF) (serin proteaza ingibitoru); tosil L-lzin xlorometil keton (TLCK) (tirozinə-bənzər serin proteaza ingibitoru).
Sitoskeletə təsir edən birləşmələr.	Falloidin, jasplakinolid (F-aktin stablləşdirən); latrunkulin, sitokalsan (F-aktin polimerləşməsi ingibitorları); taksol (mikroborucuqları stabilləşdirən); kolxisin, nokodazol, vinblastin, podofillotoksin (mikroborucuqların polimerləşməsi ingibitoru); monastrol (kinezin-5 ingibitor).
Membran daşınmasına, hüceyrədaxili hərəkətlərə və ifrazat yollarına, zülal qlikozilləşməsinə təsir edən birləşmələr	Brefeldin A (ifrazat ingibitoru); leptomisin B (nüvə zülal eksportu ingibitoru); dinasor (dinamin ingibitoru); tunikamsin (N-əlaqəli qlikozilləşmə ingibitoru)
Kinaza ingibitorları	Genistein, rapamisin, qlivek (müxtəlif spesifikliyə malik olan tirozinkinaza ingibitoru); vortmannin, LY294002 (P13 kinaza ingibitorları); staurosporin (proteinkinaza ingibitoru); roskovitin (hüceyrə tsikli CDK1 və CDK2 ingibitorları); U0126 (MEK ingibitoru)
Fosfataza ingibitorları	Tsiklosporin A, FK506, kalikulin (müxtəlif spesifikliyə malik olan protein-fosfataza ingibitorları); okadaik turşusu (serin/treonin fosfatazaların əsas ingibitoru); fenilarsin oksid, natrium ortovanadat (tirozin fosfataza ingibitoru).
Hüceyrədaxili cAMP səviyyəsinə təsir edən birləşmələr	Forskolin (adenilat tsiklaza aktivatoru)
İonlara (məsələn K^+, Ca^{2+}) təsir edən birləşmələr	A23187 (Ca^{2+} ionofor); valinomisin (K^+ ionofor); BAPTA (ikivalentli kation – (məsələn Ca^{2+}) birləşdirən/sekvester (ayıran) agenti); tapsiqargin (endoplazmatik şəbəkə Ca^{2+}-ATP-aza ingibitoru); ouabian (Na^+/K^+-ATP-aza ingibitoru)
Təbabətdə istifadə olunan bəzi dərmanlar	Propranolol (β-adrenorgik reseptor antoqonist), statinlər (HMG-CoA reduktaza ingibitorları, xolesterol sintezini blok edir), omeprazol (mədənin proton nasosunun ingibitoru)

Qeyd: Bu molekulların bəziləri geniş xüsusiyyətlərə mlikdir, bəziləri isə yüksək dərəcəd spesifikdir. Bu birləşmələrin əksəriyyəti haqqında daha çox məlumat bu dərsliyin müvafiq fəsillərində tapıla bilər.

4.1 BÖLMƏNİN ƏSASKONSEPSİYALARI

Hüceyrələrin Kulturada Artırılması və Öyrənilməsi

- Heyvan hüceyrələri onların təbii mühütinə bənzər yaradılmış şərait altında kulturada inkişaf etməlidirlər, ümumiyyətlə onlara lazım olan amin turşuları və boy faktorlarının təmin olunması tələb olunur.
- Heyvan hüceyrələrinin əksəriyyəti inkişaf edib artmaq üçün bərk səthə yapışmalıdırlar.
- İlkin hüceyrələr – onlar birbaşa toxumadan ayrılmışlardır – məhdud həyat tsiklinə malikdirlər.
- Şişlərdən alınmış hüceyrələr kimi transformasiya olunmuş hüceyrələr kulturada qeyri-məhdud (sonsuz) dərəcədə artıb çoxala bilirlər.
- Qeyri məhdud dərəcədə artan hüceyrələr hüceyrə xətləri adlanırlar.
- Çox hüceyrə xətləri, onların alındığı valideyin hüceyrələrdən fərqli xromosom sayına malik olaraq aneuploiddirlər.
- Fluoressent zülalları ekspressiya edən zülallar fluoressensiya-ilə-fəallaşan hüceyrə çeşidləyicisi (FACS) adlanan maşında çeşidlənə bilirlər
- Müxtəlif hüceyrələr, hüceyrə səthində müxtəlif marker zülalları ekspressiya edirlər, bu onları FACS maşında fərqləndirib çeşidləmək üçün istifadə oluna bilər.
- Epiteli hüceyrələri çox zaman onların funksional polyarlığını oxşatmaq üçün xüsusi qablarda yetişdirilir. Öz normal ətraf mühitini daha dəqiq əks etdirmək üçün hüceyrələr həmçinin üç-ölçülü matrisada yetişdirilə bilir.
- Yalnız bir epitopa birləşən monoklonal anticismlər hibridomalar adlanan hüceyrələr tərəfindən ifraz oluna bilirlər. Bu hibrid hüceyrələr amticism-istehsal edən B-limfositlərin ölümsüzləşmiş myeloma hüceyrələri ilə qovşaq əmələ gətirməsi və sonra da alınan klonların anticism istehsal etmək qabliyyətinin təyin olunması nəticəsində əldə olunur. Monoklonal anticismlər əsas tədqiqatlar və müalicə agentləri kimi çox əhəmiyyətlidirlər.
- Hüceyrələr intakt heyvan orqanizminə nisbətən kulturada daha asanlıqla manipulyasiya oluna bilirlər.

- Əsas bioloji proseslər spesifik hüceyrə komponentlərinə ya genetik mexanizmlərlə ya da spesifik dərmanların tətbiqi ilə müdaxilə etməklə öyrənilə bilir.
- Böyük kimyəvi kitabxanalar spesifik prosesləri hədəf edən birləşmələri, bu proseslərin öyrənilməsi və yeni dərmanların identifikasiyası üçün ekranlaşdırıla bilir.

4.2 İşıq Mikroskopiyası: Hüceyrə Quruluşunun Tədqiqi və Hüceyrə Daxilində Zülalların Vizuallaşması

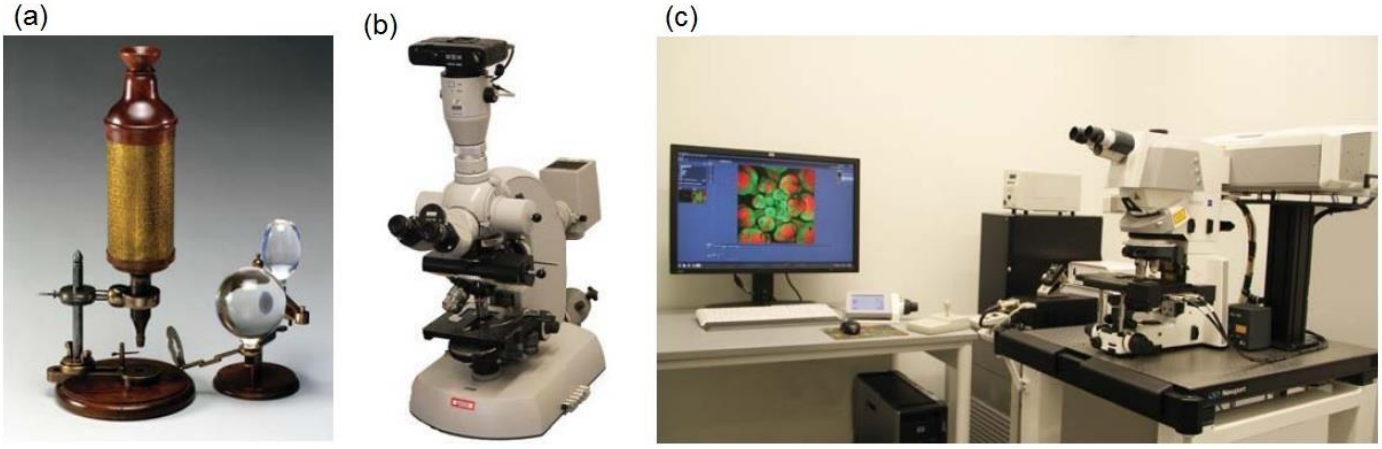
Həyatın hüceyrə əsasları ilk dəfə sadə ibtidai işıq mikroskopundan istifadə etməklə qiymətləndirilmişdir. O vaxtdan bəri, hüceyrə biologiyasındakı inkişaf işıq mikroskopundakı texnoloji inkişaflarla parallel getdi və çox vaxt onunla idarə olundu (Şəkil 4-8). Biz burada əsas inkişafların hər birini və onların hüceyrə proseslərinin tədqiqatlarını necə inkişaf etdirdiklərini müzakirə edirik. Biz ilkin olaraq, rənglənməmiş hüceyrələrin və onların quruluşlarının müşahidə olunmasında işıq mikroskopunun əsas istifadə sahələrini təsvir edirik. Sonra biz, fluoressent mikroskpun inkişafını və onun götürülmüş hüceyrələrdə xüsusi zülalların yerinin təyin olunmasında istifadə edilməsini təsvir edirik. Maraq zülalı ilə təbii fluoressent zülal arasında qovşağın ekspressiya olunması üçün molekulyar-genetik yanaşmalardan istifadə etməklə, canlı hüceyrədə spesifik zülalların lokalizasiyasını izləmək – canlı hüceyrənin təşkilinin dinamikasını aşkar etmək mümkün olmuşdur. Nümunələrin hazırlanmasındakı bu tərəqqi ilə paralel olaraq, hüceyrə quruluşunun aşkar olunmasında misilsiz dərəcədə aydınlıq əldə etmək üçün fluoressent mikroskopu ilə alınmış görüntülərin inkişaf etdirilməsi və kəskinləşdirilməsi məqsədi ilə optika sahəsində də tərəqqilər əldə edilmişdir. Bu istiqamədə çoxsaylı xüsusi texnologiyalar meydana gəlmişdir, bunların çox əhəmiyyətlilərini burada müzakirə edirik.

Bizim təsvir etdiyimiz bu metodların çoxu imkan verir ki, mikroskopda canlı hüceyrə tədqiq olunsun. Bu üstünlüklər tək *video mikroskopiyaya* imkan vermir, o həmçinin canlı hüceyrlərin və ya onların komponentlərinin spesifik stimula cavablarını və ya onların başqa hüceyrələrlə qarşılıqlı əlaqələrini də öyrənməyə imkan verir. Bu bölmədə müzakirə etdiyimiz kimi, onlar alimlərə canlı hüceyrədə fərdi komponentlərin fəaliyyətini sınaqdan keçirmək imkanlarını da verdilər.

İşıq Mikroskopunun İmkanı (Rezolyusiyası) 0.2 μm Yaxındır

Bütün mikroskoplar kiçik əşyanın (obyektin) böyüdülmüş görünüşünü yaradırlar, amma görünüşün təbiəti istifadə olunan mikroskopun tipindən və hazırlanmış tədqiqat nümunəsinin hazırlanma üsulundan asılıdır. Ənənəvi *parlaq sahənin işıq mikroskopiyasın*da istifadə olunan mürəkkəb mikroskop, tədqiqat altında olan obyektin görünüşünü böyüdən bir sıra linzalara malikdir (Şəkil 4-9a). Ümumi böyütmə fərdi linzaların böyütmələrinin cəmidir, əgər *obyektiv linza*, yəni obyektə daha yaxın olan linza 100× böyüdürsə (100× linza adətən maksimum istifadə olunandır) və *proyeksiya linzası*, bəzən okulyar və ya göz linzası adlanan linza 10-dəfə böyüdürsə, insan gözü və ya kamera tərəfindən qeyd olunan cəm böyütmə 1000-dəfə olacaq. Alternativ olaraq, işıq 10 dəfə böyüdən okulyar və ya göz linzasına yönəldilirsə, insan gözü tərəfindən qeydə alınan son böyütmə də 1000 dəfə olacaqdır.

Amma, istənilən mikroskopun ən əhəmiyyətli xassəsi onun böyütməsi deyil, onun həll etmə gücüdür və ya **rezolyusiya qabliyyəti** – iki çox yaxın yerləşmiş obyektlər arasında fərqi aşkar etmək qabliyyətidir. Əgər alınan görünüş dumanlı və ya bulanıqdırsa, nümunəni sadəcə olaraq böyütmək hələ heç bir şey demək deyil. Mikroskopun linzasının rezolyusiyası, sayca fərqləndirilə bilən iki obyekt arasındakı minimum məsafə D-yə bərabərdir. D nə qədər kiçik qiymətə malik olarsa mikroskopun imkanı (resolyusiyası) o qədər yüksək olur.



ŞƏKİL 4-8 İşıq mikroskopunun inkişafı. (a) 1660-cı illərdə Robert Hukun istifadə etdiyinə oxşar olan ilkin mikroskoplarda nümunələri görüntüləmək üçün linza və ya güzgülərdən istifadə edilmişdir. (b) Ümumi optika və işıq mikroskopları, on doqquzuncu əsirdə xüsusən hədsiz dərəcədə inkişaf etdirilmişdir. İyirminci əsirin ortalarına qədər yalnız işıq imkanları ilə məhdudlaşan yüksək dərəcədə mürəkkəb mikroskoplar geniş mövcud olmuşdur. (c) İyuirminci əsirin ikinci yarısında fluoressensiya mikroskopiyası və rəqəmsal təsvirlər konfokal texnika ilə birlikdə bügünkü geniş-imkanlı mikroskopları almaq üçün inkişaf etdirilmişdir. [(a) hissəsi SSPL via Getty Images-dən; (b) və (c) hissələr nəzakətlə A. Bretscher-dən.]

D qiyməti aşağıdakı bərabərliklə verilir,

$$D = \frac{0.61\lambda}{N \sin \alpha} \qquad (4\text{-}1)$$

burada α bucağın açılma dərəcəsi (angular aperture), və ya nümunədən obyektiv linzasına daxil olan işıq konusunun yarım-bucağı (Şəkil 4-9a), N nümunə ilə obyektivin linzası arasındakı mühütin sınma bucağı (başqa sözlə, işığın mühütdə nisbi sürəti havadakı sürəti ilə müqayisə olunur), λ isə düşən işığın dalğa uzunluğudur. Rezolyusiya qısa dalğalı işığı istifadə etməklə yaxşılaşdırılır (λ qiyməti azaldılır) və ya daha çox işıq toplayır (N və ya α artır). Yüksək rezolyusiyalı mikroskopların linzası nümunə ilə linza arasında yağ olması ilə işləmək üçün dizayn olunur, çünki yağ yüksək sındırma indeksinə malikdir (hava 1.0 və su 1.3 olmaqla müqayisədə yağ 1.56). **α** bucağını və bu səbəbdən **sin α** maksimumuna çatdırmaq üçün, linzalar nümunəni örtən örtücü şüşəyə çox yaxından fokus etmək üçün dizayn olunmuşdur. N sin α ifadəsi *ədədi apertura* (*NA*) kimi məlumdur və adətən obyektivin linzasında qeyd olunur. Yaxşı yüksək-böyüdən linza təxminən 1.4 NA qiymətinə malik olur, çox yaxşı yüksək-böyüdən linzaların qiyməti 1.5-ə çatır, və təxminən orta-ölçülü avtomobilin dəyəri qədər qiymətə malikdir! Qeyd edək ki, böyütmə bu tənliyin tərkibinə daxil deyil.

α, λ və N qiymətlərində işığın fiziki xassələrinə əsaslanan həddlərə görə, görünən işıqdan istifadə edərkən işıq mikroskopunun imkan həddi 0.2 μm (200nm)-dir. Görüntünün neçə dəfə böyüdülməsinin fərqi yoxdur, ənənəvi işıq mikroskopu heç bir zaman bir-birindən ~0.2 μm-dən az məsafədə olan və ya ölçüsü 0.2 μm-dən kiçik obyektlərin detallarını aşkar edə bilməyib. Amma, belə rezolyusiya həddini "sındırıb" keçmək üçün və bir-birindən cəmisi bir neçə nanometr məsafədə olan və ya bir neçə nanometr ölçülü obyektləri aşkar etmək üçün bəzi yeni təcrübəli texnologiyalar işlənilib hazırlanmışdır, belə super-rezolyusiyalı mikroskopu sonrakı bölmədə müzakirə edirik.

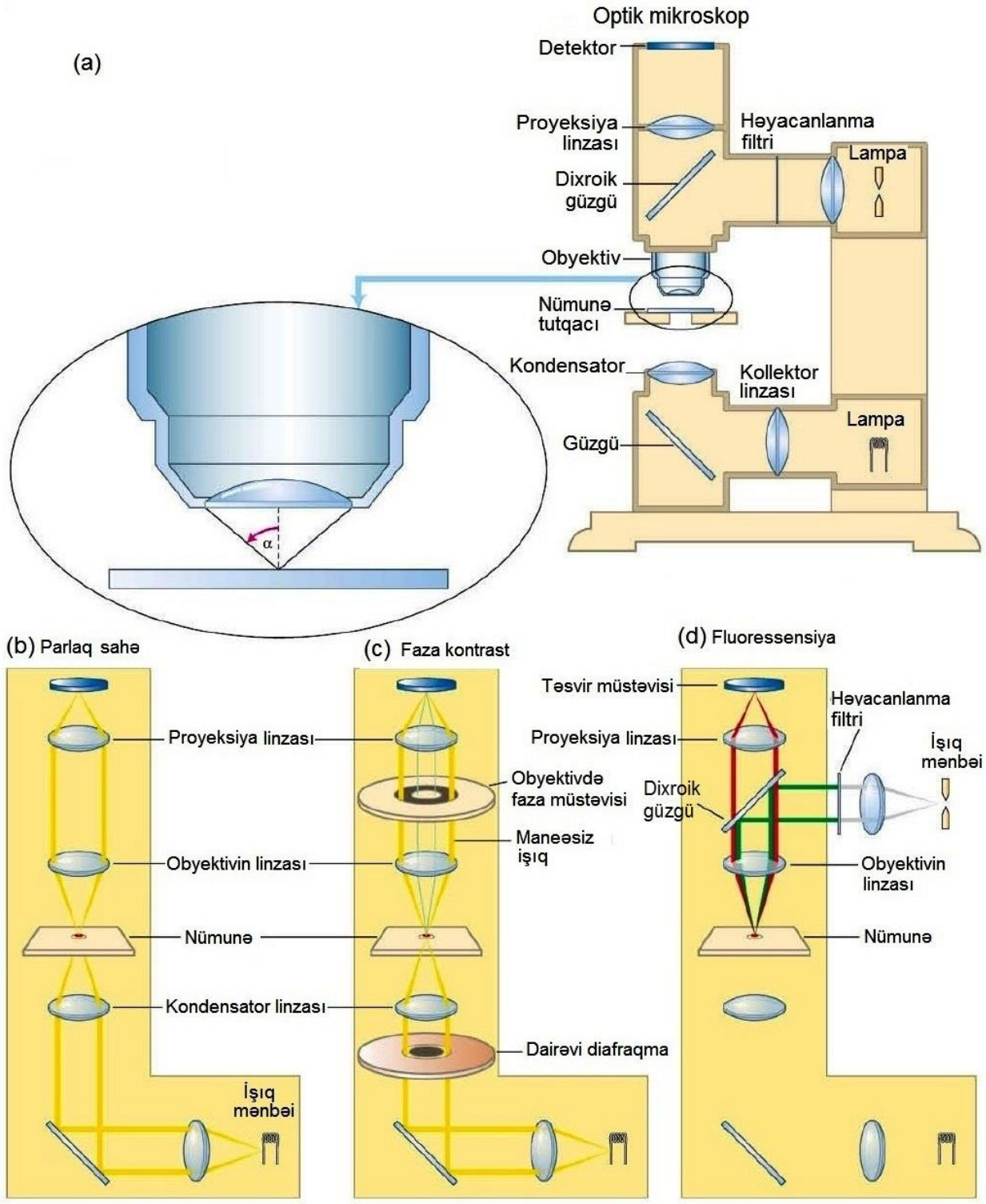
Rezolyusiyalarındakı belə çatışmazlığa baxmayaraq ənənəvi mikroskop bir neçə nanometr daxilində olan obyektləri izləməyə imkan verir. Əgər biz obyektin dəqiq ölçüsünü və formasını biliriksə—deyək ki, canlı hüceyrədə anticismə qoşulmuş 5-nm kürəvi qızıl, öz növbəsində hüceyrə-səthi zülalına birləşmişdir—və əgər biz, görüntünün sürətlə çoxsaylı rəqəmsal şəkilini çəkmək üçün kameradan istifadə ediriksə, o zaman kompüter bir neçə nanometr daxilində obyektin mərkəzini aşkar etmək üçün orta mövqeyi hesablaya biləcəkdir. Bu yolla, komputer alqoritmləri, tək-tək obyektlərin yerinin daha dəqiq səviyyədə tapılmasında istifadə oluna bilir—indiki halda, qızılla-yarlıklanmış anticismlə nişanlanan hüceyrə-səthi zülalının zamanla bağlı yerləşməsi və yerdəyişməsinin təyini—yalnız işıq mikroskopunun rezalyusiyasının imkanlarına nisbətən daha çox dəqiq olacaqdır. Bu metod, molekul və qovucuqların sitoskelet filamentlər boyu hərəkəti zamanı nanometr-ölçüdə mərhələləri ölçmək üçün istifadə olunur (bax Şəkil 17-28 və 17-29).

Faza-Kontrast və Differensial-İnterferensiya-Kontrast Mikroskopiyası Rənglənməmiş Canlı Hüceyrələri Vizuallaşdırır

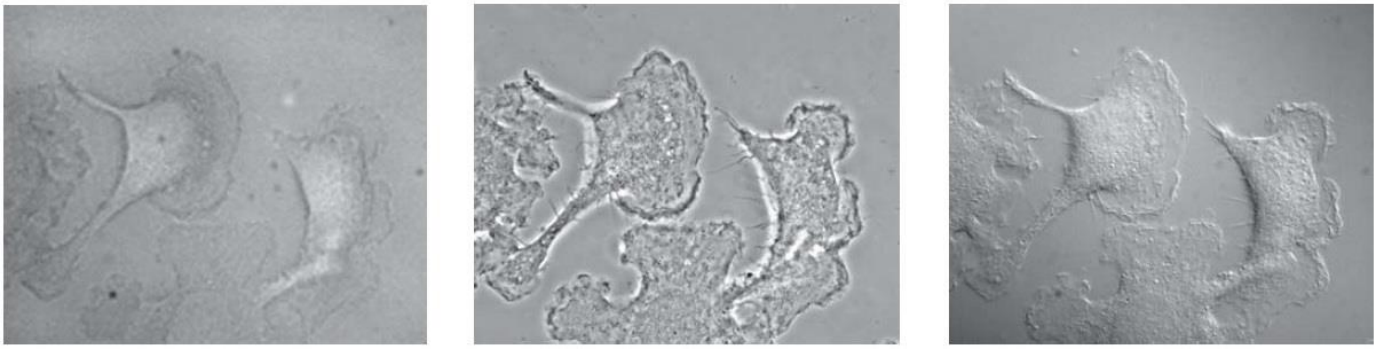
Hüceyrə70 faizə yaxın sudan, 15 faiz zülallardan, 6 faiz RNT-dən ibarədir və az miqdarda lipidlərə, DNT və kiçik molekullara malikdir. Bu molekulların əsas siniflərinin heç biri rənglənmədiyindən və işığın ötürülməsini çətinləşdirdiklərindən hüceyrələri mikroskopda görmək üçün başqa metoddan istifadə olunmalıdır. Məsələn, ən sadə mikroskopda hüceyrələrə *parlaq sahə* optikasında baxılır (Şəkil 4-9b) və az detalları görünə bilir (Şəkil 4-10). Canlı hüceyrənin və rənglənməmiş toxumanın təsvirlərini almaq üçün iki ümumi metoddan, kontrast yaratmaq üçün qırılma indeksinin fərqlərindən və hüceyrə materialının qalınlığından istifadə edilir. *Faza-kontrast mikroskopiya* və *differensial-interferensiya-kontrast* (*DIC*) *mikroskopiyası* (və ya Nomarski interferensiya mikroskopiyası) adlanan bu metodlar təzahürünə görə fərqlənən təsvirləri yaradırlar və hüceyrə arxitekturasının fərqli xüsusiyyətlərini aşkar edirlər. Şəkil 4-10-da kultura olunan canlı hüceyrələrin bu iki metodla və standart parlaq işıq mikroskopu ilə alınmış təsvirləri müqayisə edilir. Optik mikroskoplar baha olduğundan, onlar çox zaman eyni mikroskop üzərində müxtəlif mikroskopiyanın aparılması üçün quraşdırılır (bax Şəkil 4-9a-d).

Faza-kontrast mikroskopiyası təsviri yaradır, təsvirdə nümunə rayonunun qaranlıq və ya parlaqlıq dərəcəsi bu rayonun *sınma indeksindən* asılı olur. İşıq sınma indeksi yüksək olan mühütdə daha zəif hərəkət edir. Beləliklə, işıq şüaları mühütdən şəffaf obyektə keçən kimi və sonra yenidən uzaqlaşan kimi sınır. Faza-kontrast mikroskopunda, kondensatorda dairəvi diafraqma ilə yaranan işğın konusu nümunəni işıqlandırır (bax Şəkil 4-9c). İşıq nümunəni kəsərək obyektiv linzasına düşür, maneəsiz birbaşa işıq isə, işığın çox kiçik faizini ötürən və onun fazasını yüngülcə dəyişən faza lövhəsi rayonunu kəsib keçir. İşıq dalğalarının nümunəni kəsib keçən bir hissəsi sınır və dalğaların nümunədən kəsib keçməyən bir hissəsi ilə birlikdə fazadan (sinxronluqdan) çıxır. Onların fazalarının nə qədər fərqlənmələri iki yol boyunca sınma indeksinin fərqindən və nümunənin qalınlığından asılıdır. Sınan və sınmayan işıq təsvirin səthində yenidən bir yerə yığılaraq təsviri yaradırlar. Əgər işıq dalğasının iki hissəsi birləşdirilərsə, nəticədə alınan işıq fazadadırsa daha parlaq olacaq, əgər fazada deyilsə az parlaq olacaq. Faza-kontrast mikroskopiya tək bir hüceyrənin və ya nazik hüceyrə qatlarının müşahidə olunmasında istifadə olunur, amma, qalın toxumalarda olunmur. O xüsusən canlı hüceyrələrin daxilində böyük orqanoidlərin yerləşməsi və hərəkətinin müşahidələri zamanı əhəmiyyətlidir.

İşığın nümunədən keçməzdən öncə iki perpendikulyar componentlərə ayrılmasına və sonra da onların interferensiya profilini müşahidə etmək üçün yenidən birləşdirilməsinə əsasıanan DIC mikroskopiya, hədən artıq kiçik detalları və qalın obyektləri vizuallaşdırmaq üçün seçilən metoddur. Kontrast, obyektin və onu əhatə edən mühitin sınma indeksindəki fərqlərə görə yaradılır. DIC təsvirlərdə, obyekt bir tərəfə "kölgə salmış" kimi görünür. "Kölgə" əsasən nümunədə onun topoqrafiyasından daha çox sınma indeksləri arasındakı fərqlərini təmsil edir. DIC mikroskopiya asanlıqla, nüvə və vakuol kimi böyük orqanoidlərin ilkin cizgilərini müəyyən edir. "Reliefə"-bənzər görünüşə malik olmaqdan başqa, DIC təsvir obyektin nazik *optik kəsiyi* və ya dilimidir (Şəkil 4-10, *sağda*). Beləliklə qalın nümunələrdə nüvənin detalları (məsələn, intakt *Caenorhabditis elegans* həlqəvi qurdlarda; bax Şəkil 21-25d) bir sıra belə optik kəsiklərdə müşahidə oluna bilər və obyektin üç-ölçülü quruluşu fərdi DIC təsvirləri birləşdirməklə yenidən qurula bilər.



ŞƏKIL 4-9 Optik mikroskoplar adətən parlaq-sahə, faza-kontrast və ya fluoressensiya mikroskopiyası üçün konfiqurasiya olunurlar. (a) Tipik işıq mikroskopunda, nümunə adətən şəffaf şüşə slayd üzərinə quraşdırılır və hərəkət edən nümunə dayağına yerləşdirirlir. (b) Parlaq-sahə işıq mikroskopiyasında tunqsten lampasından alınan işıq kondensatorun linzası ilə dayağın altından nümunəyə yönəldilir; işıq sarı rəngdə göstərilmiş yolla keçir. (c) Faza-kontrast mikroskopiyasında, düşən işıq həlqəvi diafraqmadan kəsib keçir və işığın dairəvi həlqəsi (üzük) nümunə üzərində cəmlənir. Nümunəni maneəsiz kəsib keçən işıq obyektivin linzası ilə faza lövhəsinn qalın boz üzüyünə yönəldilir, o, birbaşa işığın bir hissəsini udur və onun fazasını dalğa uzunluğunun dörddə bri qədər dəyişir. Əgər nümunə işığı sındırırsa və ya difraksiya edirsə bəzi işıq dalğalarının fazası dəyişilir (yaşıl xətlər) və işıq dalğaları faza lövhəsinin şəffaf rayonlarını kəsib keçir. Təsviri yaratmaq üçün sındırılmış və sındırılmamış işıq təsvir lövhəsində rekombinasiya olunur. (d) Fluoressensiya mikroskopiyasında civə lampasından alınan işıq şüaları (boz xətlər), yalnız düzgün dalğa uzunluqlu işığın kəsib keçməsinə (yaşıl xətlər) imkan verən həyacanlanma filtrinə yönəldilir. Sonra işıq dixroik filtrdən əks olunur və obyektiv vasitəsi ilə nümunəyə yönəldilir. Nümunə tərəfindən buraxılan fluoressensiya işığı (qırmızı xətlər) obyektivin linzasından keçir, sonra da dixroik güzgüdən keçərək təsvir lövhəsində detektora toplanır və yazılır.



ŞƏKIL 4-10 Canlı hüceyrələr, intererferensiya ilə kontrast yaradan mikroskopiya metodu ilə vizuallaşdırıla bilər. Bu mikrofotoqrafiya parlaq-sahə mikroskopiyası (*solda*), faza-kontrast mikroskopiyası (*ortada*) və differensial-interferensiya-kontrast (DIC) mikroskopiyası (*sağda*) ilə baxılmış, kultura olunan, canlı mikrofaq hüceyrələrini göstərir. Faza-kontrast təsvirində hüceyrələr növbələşən qaranlıq və işıq bəndlərlə əhatə olunur; fokus-daxilində və fokusdan-kənar detallar faza-kontrast mikroskopunda eyni vaxtda təsvir olunur. DIC təsvirdə, hüceyrələr yalançı reliefdə (pseudorelief) aşkar olunurlar. Yalnız fokusda-olan dar rayon əks edildiyindən, DIC təsvir obyektdə olan optik dilimlərdir. [Nəzakətlə N.Watson and J.Evans tərəfindən.]

Həm faza-kontrast həm də DIC mikroskopiyası *zaman-keçid mikroskopiyasında* istifadə oluna bilər, hər ikisində filim yaratmaq üçün eyni hüceyrənin müəyyən zaman müddətində müntəzəm fasilələrlə şəkili çəkilir. Bu prosedur tədqiqatçıya hüceyrənin mikroskpun mərhələləri tərəfindən təmin edilən hərəkətini müşahidə etməyə imkan verir, göstərilən nümunənin temperatutunu və müvafiq ətraf mühüt şəraitini nizamlaya bilir.

Subhüceyrə Detalların Təsvirinin Alınması Çoxzaman Tələb Edir ki, Nümunələr Fiksasiya Olunsun, Hissələrə Bölünsün və Rənglənsin

Bizim gördüyümüz kimi, canlı hüceyrələr və toxumalar ümumiyyətlə işığı udmurlar, ona görə də demək olar ki, onlar işıq mikroskopunda görünməz olurlar. Baxmayaraq ki, belə nümunələr bizim indicə müzakirə etdiyimiz xüsusi metodlarla vizuallaşdırıla bilərlər, amma bu metodlar quruluşun incə detallarını aşkar edə bilmirlər.

İşıq mikroskopiyası üçün nümunələr, zülalları və nüklein turşularını bir-biri ilə birləşdirən eyni kimyəvi maddələrə malik olan ümumi məhlulda fiksasiya olunurlar. Formaldehid ümumi fiksativ maddə olub amin qruplarını yaxınlıqdakı (qonşu) molekullara çarpaz-əlaqələndirir, bu kovalent əlaqələr zülal-zülal və zülal-nuklein turşusu qarşılıqlı əlaqələrini stabilləşdirir və molekulları həll olmağa qarşı və sonrakı prosedurlar üçün sabit edir. Fiksasiyadan sonra, işıq mikroskopiyası ilə tədqiq etmək üçün toxuma nümunəsi parafinə keçirilir və təxminən 50 µm qalınlıqda hissələrə (kəsiklərə) ayrılır (Şəkil 4-11a). Yuxarıda qeyd olunuğu kimi, örtük şüşələr üzərində artırılan kultura olunmuş hüceyrələr kifayət qədər nazik olduğundan in situ fiksasiya olunaraq hissələrə bölünmədən işıq mikroskopunda vizuallaşdırıla bilir.

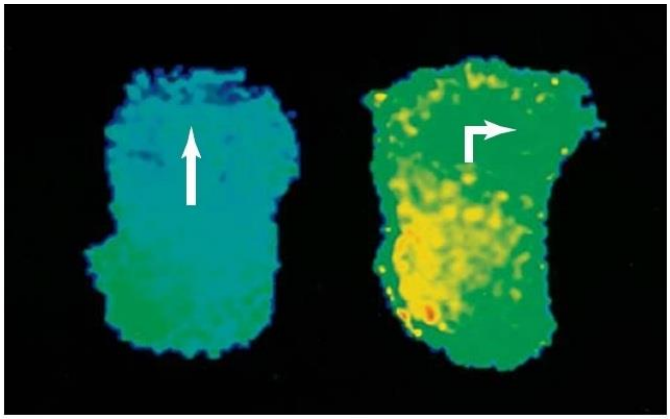
Nümunənin işıq mikroskopu üçün hazırlanmasında sonuncu mərhələ toxuma və ya hüceyrənin əsas quruluş xüsusiyyətlərini görüntüləmək üçün rənglənməsidir. Spesifik xüsusiyyətlərə malik olan molekullara birləşən çoxsaylı kimyəvi rəngləyicilər mövcuddur. Məsələn, çox zaman histoloji nümunələr *hematoksilin* və *eozin* (H&E boyası) vasitəsi ilə rənglənir. Hematoksilin, çoxsaylı müxtəlif tipli zülallarda əsasi amin turşularına (lizin və arginin) birləşdiyi halda, eozin turş molekullara (məsəlın, DNT, aspartat və qlutamatın yan zəncirlərinə) birləşir. Bu boyalar onların müxtəlif birləşmə xüsusiyyətlərinə görə müxtəlif tipli hüceyrələri vizual olaraq fərqləndirə bilən kifayət qədər fərqli rənglərdirlər (Şəkil 4-11b). Əgər ferment, reaksiyaya girən rəngsiz seləflərdən rənglənmiş və ya başqa cürə görünə bilən çöküntünü əmələ gətirən reaksiyanı kataliz edisrə, o zaman ferment hüceyrə kəsiklərində onların rənglənmiş reaksiya məhsullarına əsasən aşkar edilə bilər. Növbəti müzakirəmizdə olduğu kimi, baxmayaraq ki, belə rənglənmə metodları bir zaman kifayət qədər çox istifadə olunub, artıq xüsusi zülalların vizuallaşdırılmasında başqa metodlarla geniş şəkildə əvəz olunurlar.

Fluoressent Mikroskopiya Canlı Hüceyrələrdə Spesifik Molekulları Lokalizasiya və Miqdarca Təyin Edə Bilir.

Hüceyrə daxilində molekulların işıq mikroskopiyası ilə lokalizasiyasında hərtərəfli və güclü metod yəqin ki, hüceyrələrin **fluoressent rənglənməsi** və *fluoressensiya mikroskopiyasnda* müşahidə olunmasıdır. Əgər kimyəvi maddə işığı bir dalğa uzunluğunda udursa (həyacanlanma dalğa uzunluğu) və xüsusi daha uzun dalğa uzunluğunda biraxırsa (fluoressensiya edir) onda bu maddəyə *fluoressent* maddə deyilir. Fluoressent nümunələri müşahidə etmək üçün istifadə olunan müasir mikroskoplar həyacanlandırma işığının obyektivin linzasından keçərək nümunəyə daxil olması və sonra da obyektivin linzasından keçərək nümunədən qayıdan buraxılan (emissiya olunan) fluoressent işığın selektiv müşahidəsi kimi konfiqurasiya olunurlar. Bu, həyacanlandırma işığının dixroik güzgü adlandırılan xüsusi tip filtrdə nümunə daxilinə refleksiya olunması və udulmuş işığın daha uzun dalğa uzunluğunda emisssiya edərək müşahidəçidən keçməsinə imkan verməsi ilə əldə olunur (bax Şəkil 4-9d). Burada biz spesifik molekulların hüceyrədə müşahidə edilməsində istifadə edilə bilən fluoressent mikroskopiyanın bir neçə yolunu müzakirə edirik.

Hüceyrədaxili Iion Qatılıqları İona-Həssas Fluoressent Boyalarla Təyin Ediə Bilər

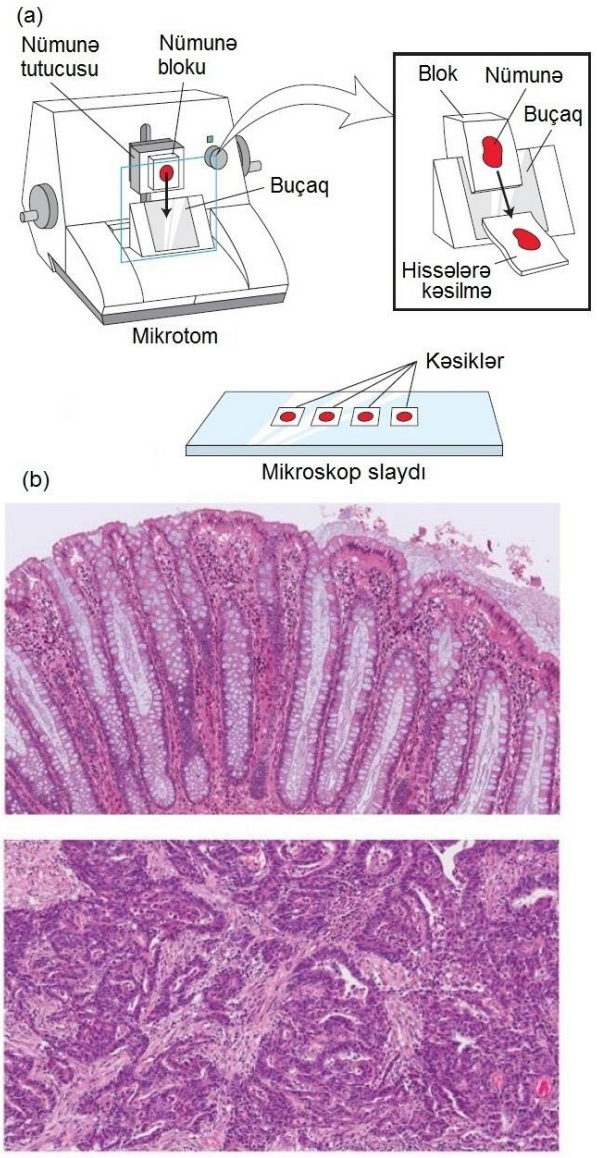
Canlı hüceyrə daxilində Ca^{2+} və ya H^+-in qatılığı, fluoressensiyası bu ionların qatılığından asılı olan fluoressent boyaların və ya *fluoroxromların* köməyi ilə ölçülə bilər. Sonrakı fəsillərdə müzakirə olunduğu kimi, hüceyrədaxili Ca^{2+} və H^+ qatılıqları çoxsaylı hüceyrə proseslərinə təsir edir. Məsələn, çox hormonlar və başqa stimullar sitozolda Ca^{2+}-un son nəticədə sakitlikdəki 10^{-7} M-dan 10^{-6} M qədər artmasına səbəb olur, bu da hüceyrənin əzələ dartılmaları kimi müxtəlif cavab reaksiyalarını induksiya edir.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 4-12 Ca^{2+}-a-həssas fluoroxrom Fura-2, canlı hüceyrələrin müxtəlif rayonlarında sitozol Ca^{2+}-un nisbi qatılğının aşkar olunması üçün istifadə oluna bilər. (*Solda*) Hərəkətdə olan leykositlərdə Ca^{2+} qradienti qurulmuşdur. Ən yüksək səviyyələr (yaşıl) hüceyrənin kortikal dartılma baş verən arxa hissəsindədir, ən aşağı səviyyə (mavi) isə hüceyrənin aktin polimerləşməsinin baş verdiy ön hissəsidir. (*Sağda*) Kemotaktik molekullarla doldurulmuş pipet hüceyrənin yan tərəfinə yerləşdiriləndə hüceyrəni induksiya edərək Ca^{2+} qatılığını ani olaraq bütün sitoplazma boyu qaldırır və yeni qrdaient qurulur. Qradient elə yönəlir ki, aşağı Ca^{2+} səviyyəsi olan rayon (mavi) hüceyrənin dönəcəyi istiqamətdə yerləşir, halbu ki, yüksək Ca^{2+} olan rayon (sarı) həmişə hüceyrənin arxasının formalaşacağı tərəfdə olur. [R.A. Brundage et al., 1991, Science 254:703-dən, hörmətlə F. Fay tərəfindən.]

Ca^{2+}-a həssas olan fluoressent boya *fura*-2, etanolla efir əlaqələri yaradan beş karboksil qrupuna malikdir. Nəticədə yaranan fura-2 efiri lipofildir və plazma mebrandan keçərək mühitdən hüceyrəyə diffuziya edə bilir. Sitozol daxilində esterazalar fura-2 efirini hidroliz edib fura-2-ni əmələ gətirir və onun sərbəst hidroksil qrupları molekulu qeyri-lipofil edir, bununla da, onun hüceyrə membranlarını kəsib keçməsinə imkan vermir ona görə də o sitozolda qalır. Hüceyrə daxilində, hər bir fura-2 molekulu bir Ca^{2+} ionunu birləşdirə bilir, amma digər hüceyrə kationunu birləşdirə bilmir. Müəyyən diapozonda sitozol Ca^{2+} qatılığına mütənasib olan bu birləşmə xüsusi bir dalğa uzunluğunda fura-2-nin fluoressensiyasını artırır. İkinci bir dalğa uzunluğunda, fura-2-nin fluoressensiyası Ca^{2+}-un birləşib birləşməməsindən asılı olmayaraq eyni qalır və verilmiş hüceyrə rayonunda fura-2-nin ümumi miqdarının ölçülməsini mümkün edir. Fluoressent mikroskopunda hüceyrənin davam edın şəkildə tədqiq olunması və bu iki dalğa uzunluqlarında fura-2 fluoressensiyasının nisbətinin sürətli dəyişilmələrinin ölçülməsi ilə Ca^{2+} ionlarına birləşmiş fura-2 fraksiyalarında kəskin dəyişilmələrin miqdarını və beləliklə də sitozol Ca^{2+} qatılığındakı dəyişilmələri ölçmək olar (Şəkil 4-12). Eyni ilə,

.



ŞƏKİL 4-11 İşıq mikroskopu üçün toxumalar fiksasiya olunur, bərk mühitə keçirilir və kəsiklərə ayrılır. (a) Fiksasiya olunmuş toxuma, bir sıra spirt-su məhlullarında islatmaqla və sonda daxilə yüklənmə (embedding) mühitinə uyğun olan üzvi həlledici məhlulla yekunlaşdırmaqla dehidrasiya olunur. Toxumanı kəsiklərə hazırlamaq üçün onu maye parafinə yükləyirlər. Nümunə keçirilmiş parafin blok bərkiyən kimi o, mikrotonun tutqacına bərkidilir və nazik kəsiklər mikrotonun bıçağı ilə kəsilir. İşıq mikroskopu üçün tipik nazik kəsiklər 0.5-50 μm qalınlıqda olur. Kəsiklər mikroskopun əşya şüşəsi üzərində toplanır və uyğun reagentlə rənglənir. (b) Siçanın bağırsağından hazırlanmış kəsik H&E boyası ilə rənglənmişdir. [(b) hissəsi nəzakətlə Kornel Universitetində Alıeksandr Nikitin tərəfindən.]

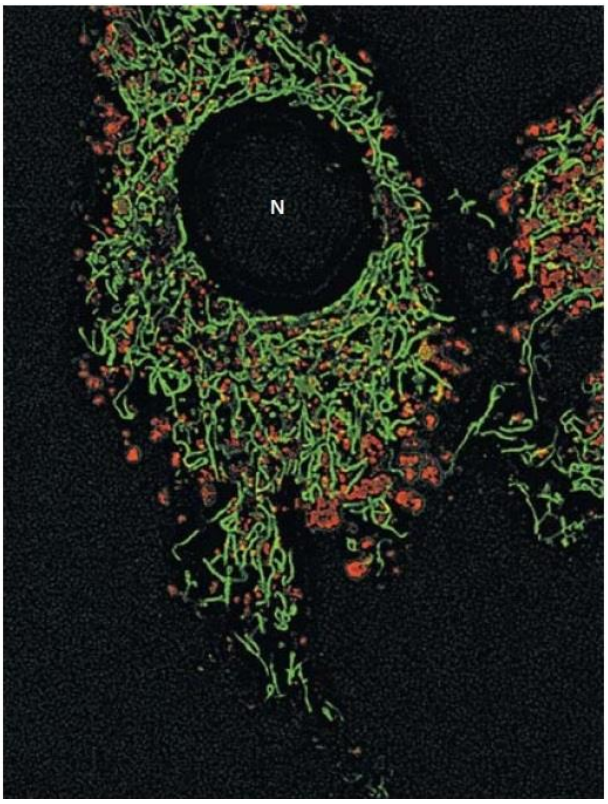
H^+ qatılığına həsas olan fluoressent boyalar (məsələn, SNARF-1) canlı hüceyrələrdə sitozol pH qiymətinin monitorinqində istifadə oluna bilər. Başqa istifadə oluna bilən, zəif əsaslarla əlaqəli fluoroxromdan təşkil olunmuş problar neytral pH-da yalnız qismən protonlaşırlar və sərbəst şəkildə hüceyrə membranına nüfuz edə bilirlər. Amma, turş orqanoidlərdə bu problar protonlaşmış olurlar, çünki protonlaşmış problar

orqanoid membranını kəsib keçə bilmirlər, onlar sitozolda olan qatılıqdan dəfələrlə çox-çox yüksək olan qatılıqda lumenlərdə toplanırlar. Beləliklə, bu tip fluoressent boyalar xüsusən də canlı hüceyrələrdə mitixondrilərin və lizosomların rənglənməsində istifadə oluna bilirlər (Şəkil 4-13)

İmmunofluoressensiya Mikroskopiyası Fiksə Olunmuş Hüceyrələrdə Spesifik Zülalları Aşkar Edə Bilir

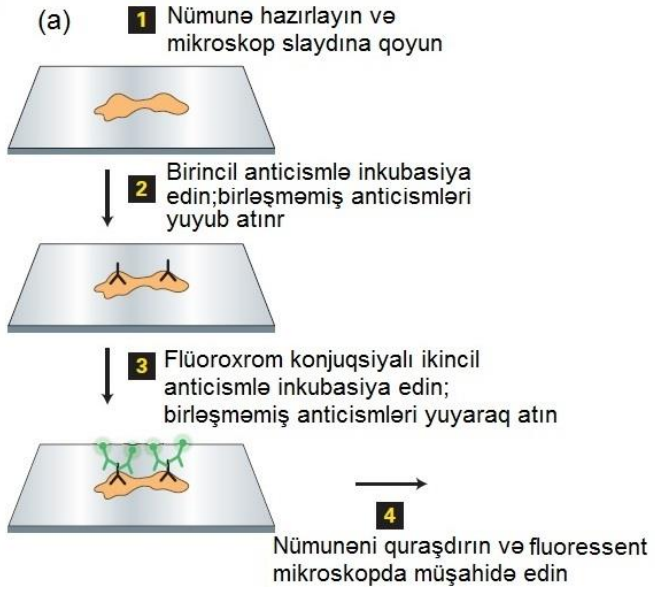
Yuxarıda qeyd olunan ümumi kimyəvi boyalar nuklein turşularını və ya geniş zülallar sinifini rəngləyir, ama spesifik zülalların mövcud olmasının və onların lokalizasiyasının aşkar olunması daha informativdir. *İmmunofluoressensiya mikroskopiyası*, fluoressent boyaların kovalent qoşulduğu anticismlərlə spesifik zülalların aşkar olunması üçün daha geniş istifadə olunan metoddur. Bunu etmək üçün, sizə ilk növbədə sizin spesifik maraq zülalına anticism yaratmağınız lazımdır. Bölmə 4.1-də qısaca və Fəsil 23-də geniş detalları ilə təsvir edildiyi kimi, yoluxmaya cavab reaksiyası olaraq onurğalıların immun sistemi anticismlər adlanan zülalları istehsal edirlər ki, bunlar da xüsusi olaraq yoluxucu agentlərə birləşirlər. Hüceyrə bioloqları xüsusi zülallara spesifik olan anticismləri istehsal etmək üçün immunoloji cavab reaksiyasından istifadə etdilər. Hesab edin ki, siz X zülalını təmizləmisiz, sonra onu eksperimental heyvana keçirmisiz və o heyvan, zülala qarşı yad molekul kimi cavab reaksiyası verir. Bir neçə həftə müddətindən sonra, heyvan immun cavabını yaradacaq və X zülalına ("antigenə") qarşı anticismlər istehsal edəcək. Əgər siz bu heyvanın qanını toplasaz o, bütün başqa qan zülalları ilə birlikdə, çoxsaylı müxtəlif antigenlərə qarşı olan anticismlərlə bir qatışıqda X zülalına qarşı anticismə də malik olacaqdır. Siz indi X zülalını daşıyıcı resinə kovalent birləşdirməklə və afin xromotoqrafiyasından istifadə etməklə, yuxarıdakı anticismlərdən yalnız X zülalına spesifik olan anticismləri birləşdirərək kolonkada selektiv saxlaya bilərsiz. Bu anticismlər resindən elusiya oluna bilər və beləliklə, artıq siz X zülalına spesifik birləşən reagentə malik olursuz. Heyvanda olan çoxsaylı hüceyrələr anticismin yaradılmsında iştirak etdiyindən bu cürə yanaşma *poliklonal anticismləri* əmələ gətirəcəkdir. Bu fəsilin əvvəlində təsvir etdiyimiz kimi, alternativ olaraq, X zülalında spesifik epitopa qarşı anticismləri ifraz edən klonal hüceyrə xətlərini yaratmaq mümkündür; bunlara *monoklonal anticismlər* deyilir.

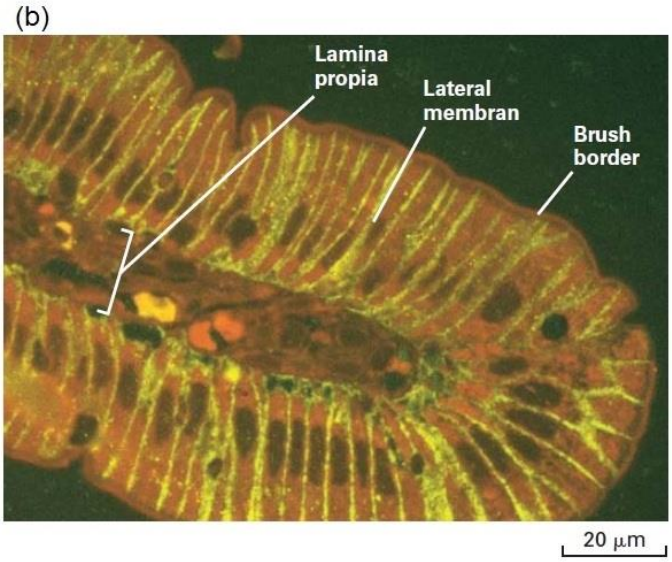
Zülalların yerinin təyin olunması üçün anticismlərdən hər-hansı bir tipinin istifadə olunması zamanı hüceyrələr və ya toxuma fiksasiya olunmalıdır və əmin olunmaldır ki, onun bütün komponentləri öz yerindədir və anticismlərin hüceyrəyə daxil olması üçün onun keçiriciliyi təmin olunmalıdır, ümumiyyətlə bu, hüceyrələri qeyri-ionlaşdırıcı detergentlərlə inkubasiya etməklə və ya lipidləri üzvi həlledicilərlə ayırmaqla əldə olunur. İmmunofluoressensiya mikroskopiyasının bir versiyasında anticism fluoroxroma kovalent birləşdirilir. Klassik istifadə olunan fluoroxromlara, qırmızı işığı buraxan (emissiya) rhodamin və Texas qırmızısı, narıncı işığı buraxan Cy3, və yaşıl işığı buraxan fluoressien daxildirlər, amma son zamanlar buraxılan (emissiya) dalğa uzunluğu mavi işıqdan uzun qırmızı işığa qədər olan daha yeni və daha fotostabil fluoroxromlar yaradılıb inkişaf etdirilmişdir. Fluoroxrom-anticism kompleksi keçiriciliyi təmin olunmuş toxuma kəsiyinə və ya hüceyrəyə əlavə olunanda, kompleks müvafiq antigenə birləşəcək, sonra da həyacanlandırma dalğa uzunluğu ilə şüalandırdıqda işıq buraxacaq. Nümunənin fərqli dalğa uzunluğunda fluoressensiya edən fərqli boylarla rənglənməsi eyni hüceyrə daxilində çoxsaylı zülalların və eləcə də DNT molekulunun yerinin aşkar olunmasına mkan verir (fəsilin giriş şəkilinə bax).



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 4-13 İnəyin kultura olunan ağciyər arteriyasının endotelial canlı hüceyrələrində mitoxondri və lizosomların yerinin aşkar olunması. Hüceyrələr, spesifik olaraq mitoxondrilərə birləşmiş yaşıl-fluoressensiya edən boya ilə və spesifik olaraq lizosomların daxilinə keçirilmiş qırmızı-fluoressensiya edən boya ilə rənglənmişdirlər. Təsvir bu fəslin sonrakı hissələrində müzakirə olunacaq dekonvolusiya kompüter proqramlarından istifadə edərək dəqiqləşdirilmişdir [2015 Thermo Fisher Scientific inkorporasiyası, İstifadə üçün razılıq alınmışdır.]

Bu metodun daha çox istifadə olunan variasiyası, *dolayı immunofluoressensiya mikroskopiyası* (*indirect immunofluorescence microscopy*) adlanır, çünki maraq zülalına olan spesifik anticism dolayı yolla aşkar edilir. Bu metodda, nişanlanmamış monoklonal və ya poliklonal anticismlər hüceyrəyə və ya fiksasiya olunmuş toxumaya tətbiq olunur, ardınca da birinci anticismin konstant (Fc) seqmentinə birləşən fluoroxrom nişanlanmış ikinci anticism istifadə edilir. Məsələn, "ikinci" anticism, bütün dovşan IgG anticismləıri üçün ümumi olan Fc seqmenti ilə keçini immunizasiya etməklə yaradıla bilər, bu ikinci anticism preparatı ("keçi anti-dovşan" adlandırılır) fluoroxroma birləşəndə hüceyrə və toxumanın təyinində istifadə olunan istənilən dovşan anticismini aşkar edəcək (Şəkil 4-14).





ŞƏKİL 4-14 Xüsusi zülallar fiksasiya olunmuş toxuma kəsiklərində dolayı immunofluoressensiya mikroskopiyası yolu ilə lokalizsiya oluna bilər. Zülalı dolayı immunofluoressensiya mikroskopiyası yolu ilə lokalizasiya etmək üçün toxuma kəsiyi, və ya hüceyrələrdən götürülmüş nümunə kimyəvi yolla fiksasiya olunmalıdır və anticismlərin daxil olması üçün keçiricilik qabliyyəti təmin edilməlidir (pillə 1). Sonra nümunə, maraq antigeninə spesifik birləşən birinci anticismlə inkubasiya olunur və ardınca birləşməmiş anticismlər yuyulmaqla uzaqlaşdırılır (pillə 2). Ardınca, nümunə birinci anticismə spesifik birləşən, fluoroxromla-yarlıklanmış ikinci anticismlə inkubasiya olunur və yenə də, ikinci anticismin birləşməmiş qalan artıq hissəsi yuyulmaqla uzaqlaşdırılır (pillə 3). Bundan sonra nümunə ixtisaslaşdırılmış montaj mühütinə yerləşdirilir və fluoressensiya mikroskopunda tədqiq edilir (pillə 4). Bu nümunədə, siçovulun bağırsaq divarının kəsiyi, qeyri spesifik qırmızı fluoressensiya yaradan Evans mavi ilə və qlükozanın transport zülalı GLUT2 ilə rənglənmiş, dolayı immunofluoressensiya mikroskopiyası ilə lokalizasiya olunmuşdur. GLUT2 bağırsaq hüceyrələrinin bazal və lateral tərəflərində görünür, hüceyrələrin bağırsaq lumeninə tərəf baxan apikal səthində daha sıx yerləşən mikrovillərdən təşkil olunmuş xovlu tərəfində isə görünümr. Kapillyarlar selikli qişanın xüsusi səthindən (lamina proporia) uzanır, boş birləşdirici toxuma epiteli qatının altında yerləşir. [(b) hissəsi B.Thorens et al., 1991, *Am.J.Physiol*.**259**:C279, hörmətlə B.Thorens-dən.]

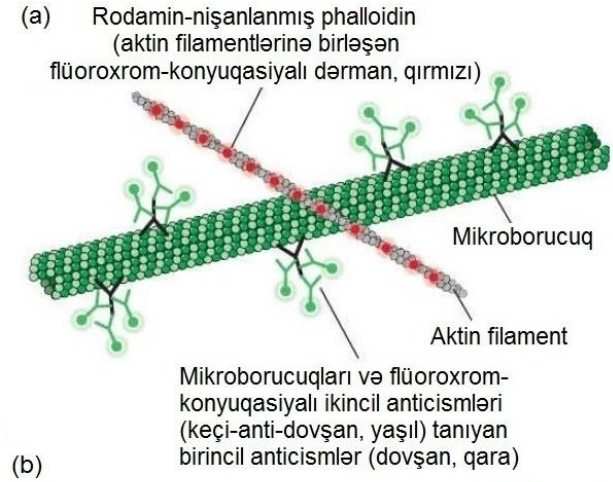
Bir neçə keçi anti-dovşan anticism molekulları nümunədə tək bir dovşan anticism molekuluna birləşə bildiyindən, yaranan fluoressensiya tək fluoroxrom-yarlıklanmış anticism istifadə olunmasına nisbətən daha çox parlaq olacaq. Çox zaman bu cürə yanaşma, *ikiqat-nişanlanmış fluoressensiya mikroskopiyası* kimi geniş istifadə olunur, çünki burada iki zülal eyni zamanda vizuallaşdırıla bilər. Məsələn, hər iki zülal, müxtəlif heyvanlarda (məsələn, dovşanda və ya toyuqda) yaradılmış birinci anticismdən və müxtəlif fluoroxromlarla yarlıklanmış uyğun olan ikinci anticismdən (məsələn, keçi anti-dovşan və qoyun anti-toyuq) istifadə etməklə dolayı immunofluoressensiya mikroskopiyası vasitəsi ilə vizuallaşdırıla bilər. Digər variasiyada, bir zülal dolayı immunofluoressensiya mikroskopiyası yolu ilə, ikinci zülal isə ona spesifik birləşən boya ilə vizuallaşdırıla bilər. Fluoressensiya mikroskopunda fərdi təsvirlər alındıqdan sonra, onların görüntüləri elektron yolu ilə birləşdirilə bilər. (Şəkil 4-15).

Bu texnologiyanın digər geniş istifadə olunan versiyasında, molekulyar biologiyanın metodları *epitop yarlık* adlanan, amin turşularının qısa ardıcıllığının qovşaq olunduğu rekombinant zülalları kodlaşdıran kDNT-nin yaradılmasında istifadə olunur. Bu kDNT-lər hüceyrədə ekspressiya olunarkən xüsusi yarlıka birləşdirilmiş zülalı istehsal edəcək. İki çox istifadə olunan epitop yarlık, DYKDDDDK (bir-hərfli aminturşu kodu) aminturşu ardıcıllığını kodlaşdıran FLAG adlanan, və EQKLISEEDL ardıcıllığını kodlaşdıran myc adlanan yarlıklar. FLAG və ya myc epitoplara olan kommersiya mənşəli fluoroxrom-birəşən monoklonal anticismlər sonra hüceyrədə rekombinant zülalları aşkar etmək üçün istifadə oluna bilər. İki zülalın eyni zamanda vizuallaşmasına imkan vermək üçün bu texnologiyanın geniş istifadəsində bir zülal FLAG ilə, digər zülal isə myc ilə yarlıklana bilər. Hər iki yarlıklanmış zülal sonra müxtəlif rənglə, məsələn, Aleksa-488-nişanlanmış anticism (yaşıl işığı buraxır) myc epitopla, Aleksa-568-nişanlanmış anticism (qırmızı işığı buraxan) isə FLAG epitopla vizuallaşdırılır.

Fluoressent Zülallarla Yarlıklama Canlı Hüceyrələrdə Spesifik Zülalların Vizuallaşdırılmasına İmkan Verir

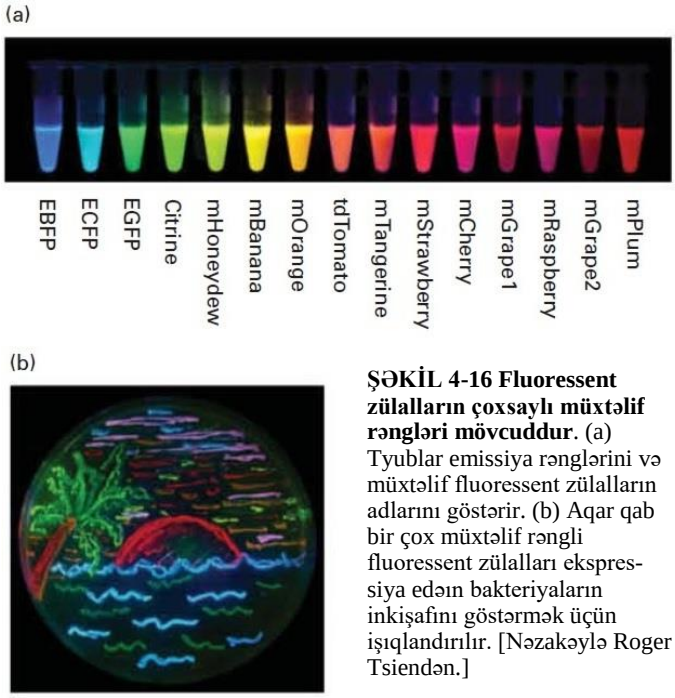
Jellifish *Aequorea victoria yaşıl fluoressent zülal* (GFP, ~27 kDa) adlanan təbii fluoressent zülalı ekspressiya edir. GFP, yan zəncirləri spontan şəkildə tsiklləşərək mavi işıqla işıqlandırılanda yaşıl-fluoressensiya edən xromoforu əmələ gətirən serin, tirozin və qlisin ardıcıllığına malikdir. Rekombinant DNT texnologiyasından istifadə edərək, maraq zülalının kodlaşdırıcı DNT ardıcıllığına GFP kodlaşdıran ardıcıllığın qovşaq olunmuş konstruktunu yaratmaq olar. Bu konstrukt hüceyrələrə keçirilib ekspressiya olunanda, maraq

zülalının kovalent rabitə ilə eyni polipeptidin bir hissəsi kimi GFP zülala qovşaq olunduğu GFP "yarlıklanmış" zülal əmələ gəlir. Baxmayaraq ki, GFP orta ölçülü zülaldır, maraq zülalının fəaliyyəti çox zaman onun GFP ilə qovuşmasına görə dəyişilmir.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 4-15 İkiqat-nişanlanmış fluoressensiya mikroskopiyası iki zülalın nsbi yerləşmələrini vizuallaşdıra bilər. İkiqat-nişanlanmış fluoressensiya mikroskopiyasında hər bir zülal xüsusi fərqli fluoroxromla nişanlanmalıdır. (a) Kultura olunmuş hüceyrələr fiksasiya olunur, keçiricilik qabliyyəti təmin olunur və sonra, Rhodamin-nişanlanmış falloidin, flament aktininə spesifik birləşən reagentlə inkubasiya olunur. O həmçinin, mikroborucuqların əsas komponenti olan tubulinə spesifik olan dovşan anticismi ilə də inkubasiya olunmuşdur, ardınca da fluoressent-nişanlanmış ikinci keçi-anti-dovşan anticismlə inkubasiya olunur. (b) Yuxarı panellər sağ tərəfdə fluoressein-nişanlanmış tubulini (*solda*) və Rhodamin-rənglənmiş aktini (*sağda*) göstərir, aşağı paneldə isə təsvirlərin elektron yolla birləşdirilməsu verilir. [(b) hissəsi hörmətlə A. Bretscher tərəfindən.]

Bu metod, GFP-ni vizuallaşdırmağa və bununla da maraq zülalını vizuallaşdırmağa imkan verir. Tədqiqatçı yalnız GFP-yarlıklı zülalın lokalizasiyasını deyil, o həmçinin onun hüceyrə daxilində zaman müddətindən asılı olaraq paylanmasını da görə bilir və onun dinamikasını qiymətləndirə və ya növbəti bir neçə hüceyrə işləmələri zamanı lokalizasiyasını izləyə bilir. Spesifik zülalların GFP ilə sadə yarlıklanma ideyası hüceyrə biologiyasında inqilab etdi və çoxsaylı müxtəlif fluoressent zülalların aşkar olunmasına və inkişafına səbəb oldu (Şəkil 4-16). Fluoressent zülalların bu cürə rəng müxtəlifliyinin istifadə edilməsi iki və daha artıq zülalı, əgər bu zülalların hər biri fərqli-rənglənən fluoressent zülallarla yarlıklanmışsa, eyni zamanda vizuallaşdırımağa imkan verir. Fluoressent zülalların istifadə edildiyi başqa metodları biz sonrakı bölmələrdə təsvir edirik.



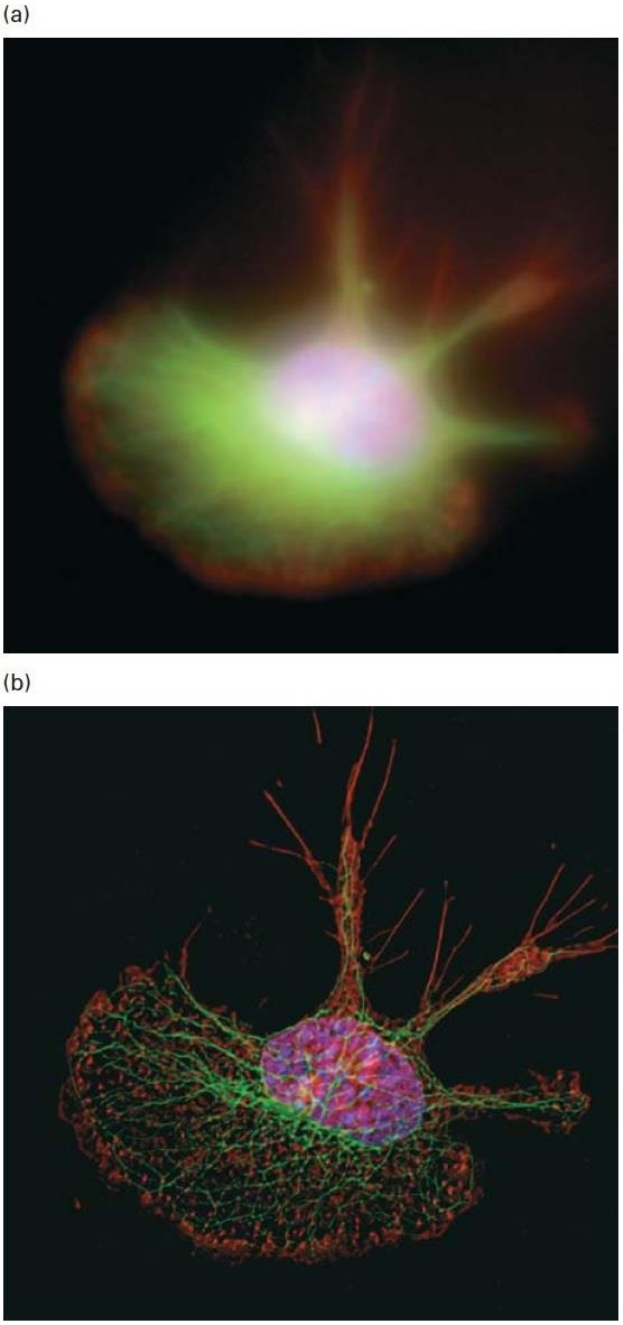
ŞƏKİL 4-16 Fluoressent zülalların çoxsaylı müxtəlif rəngləri mövcuddur. (a) Tyublar emissiya rənglərini və müxtəlif fluoressent zülalların adlarını göstərir. (b) Aqar qab bir çox müxtəlif rəngli fluoressent zülalları ekspressiya edən bakteriyaların inkişafını göstərmək üçün işıqlandırılır. [Nəzakəylə Roger Tsiendən.]

Dekonvolusiya və Konfokal Mikroskopiya Fluoressent Obyektlərin Üç-Ölçülü Vizuallaşdırılmasını Gücləndirir

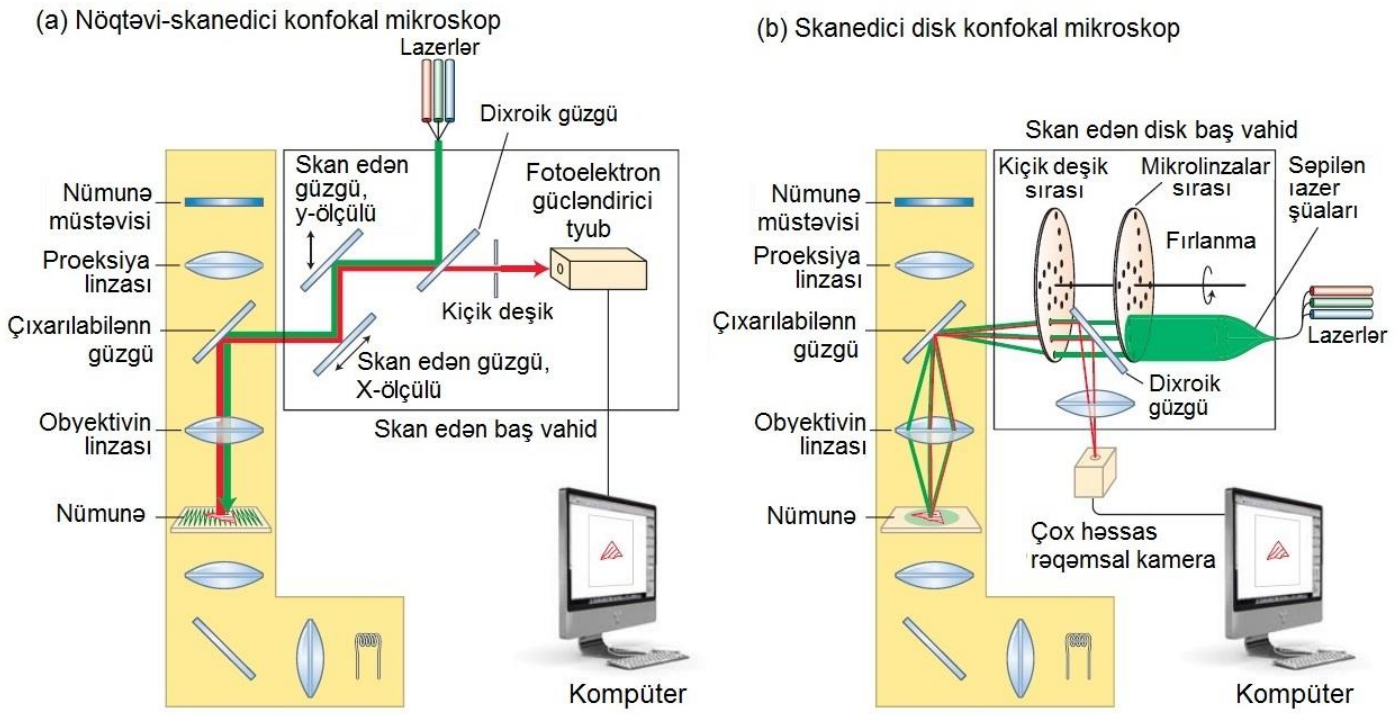
Ənənəvi fluoressensiya mikroskopiyası iki əsas məhdudiyyətə malikdir. Birincisi, nümunə tərəfindən emissiya olunan fluoressent işıq yalnız fokus müstəvisindən gəlmir, o həmçinin ondan aşağıda və yuxarıda olan molekullardan da gəlir, beləliklə, müşahidəçi hüceyrənin çox dərinliklərindəki molekullardan gələn fluoressent təsvirin üst-üstə düşməsinin səbəb olduğu bulanıq təsviri görür. Bulanıq effekt həqiqi molekullyar düzülüşün təyin edilməsini çətinləşdirir. İkincisi, qalın nümunələrin vizuallaşdırılmasıdır, nümunədə müxtəlif dərinliklərdən alınan serial təsvirlər toplanmalı və sonra da orjinal qalın toxumadakı quruluşları konstruksiya etmək üçün düzlənməlidir. Yüksək-imkanlı (rezolyusiyalı) üç-ölçülü məlumatı əldə etmək üçün iki əsas yanaşma işlənilib hazırlanmışdır. Bu metodların hər ikisi təsvirin elektron toplanmsını elə tələb edir ki, o kompüter vasitəsi ilə lazımı şəkildə manipulyasiya oluna bilsin.

*Dekonvolusiya mikroskopiya*sı adlanan birinci yanaşma, nümunənin fokusdan-kənar hissələrindən gələn fluoressensiyanın uzaqlaşdırılmasında kompüter metodlarından istifadə edir. Hesab edək ki, üç-ölçülü nümunənin təsvirləri üç müxtəlif fokus müstəvisindən yazılır. Bütün nümunə işıqlandırıldığından, 2-ci müstəvidən alınan təsvir 1-ci və 3-cü müstəvinin fokusdan-kənar fluoressensiyasına da malik olacaqdır. Əgər biz dəqiqliklə biliriksə 1-ci və 3-cü müstəvinin fokusdan-kənar fluoressensiyası 2-ci müstəviyə necə toplanır, onda biz onu kompüter vasitəsi ilə asanlıqla uzaqlaşdıra bilərdik. Bu informasiyanı xüsusi bir mikroskop üçün əldə etməkdən ötrü, çox kiçik fluoressent dənəciklərə malik olan sınaq kəsikdən (slayddan) fokus müstəvisinin serial təsvirləri edilir. Hər bir dənəcik, öz fokus müstəvisindən kənarda bulanıq dumanlı obyekti əmələ gətirən işıq nöqtəsini təmsil edir, biz bu təsvirlərdən *nöqtə səpilməsi funksiyası*nı (*point spread function*) təyin edə bilirik, bu da bizə fokusdan-kənar "bulanıqlığın" yaranmasına kömək edən fluoressent nöqtə mənbələrinn paylanmasını hesablamağa imkan verir. Mikroskopu bu şəkildə kalibrovka etməklə, təsvirlərin eksperimentaıl seriyası kompüterlə dekonvolvasiya oluna bilər. Təsvirlərin toplanası üçün avtomatik mərhələlərə malik olan mikroskop və təsvirləri dekonvolusiya edən müvafuq proqramlar kommersiya yolu ilə alına bilər. Dekonvolyusiya yolu ilə yazılan təsvirlər, Şəkil 4-17-də göstərildiyi kimi, heç bir bulanıqlıq olmadan çox güclü detalları əks etdirir.

Daha yaxşı üç-ölçülü informasiyanın alınması üçün ikinci yanaşma, *konfokal mikroskopiya* adlanır, çünki o, spesifik fokus müstəvisinin təsvirlərini almaq üçün optikal metodları istifadə edir və başqa müstəvilərdən gələn işıqları buraxmır. Konfokal mikroskoplar nümunənin şaquli dərinliyindən fokuslanaraq gələn serial təsvirləri toplayir, bnlardan da kompüter yolu ilə dəqiq üç-ölçülü təsvirləri yaratmaq mümkündür. Bu gün, iki tip konfokal mikroskop çox geniş istifadə olunur, *nöqtəvi skanedən* konfokal mikrosk (bu *lazer-skaninq konfokal mikroskop* və ya *LSCM* kimi də məlumdur) və *fırlanan disk* (*spinning disk*) konfokal mikroskop. Hər iki mikroskop üçün ideya ondan ibarətdir ki, hər biri işıqlandırır və buraxılan (emissiya) fluoressent işığı fokus müstəvisinin yalnız kiçik bir sahəsinə elə bir şəkildə toplayır ki, fokusdan-kənar işıq istisna edilir (buraxılmır). Bu, emissiya olunan işığın detektora çatmazdan öncə kiçik deşikdən keçərək toplanması ilə – fokus müstəvisindən gələn işığın kəsib keçməsi, amma digər fokus müstəvilərindən gələn işığın isə kəskin şəkildə buraxılmaması ilə əldə oluna bilir. İşıqlandırılmış sahə sonra elektron təsviri yaratmaq üçün bütün fokus müstəvisini kəsib keçir. Bu iki tip mikroskop təsviri necə əhatə etmələrinə görə fərqlənirlər. Nöqtəvi-skanedən mikroskop, fokus müstəvisini raster modelində sürətlə (cəld) skan etmək üçün həyacanlandırma dalğa uzunluğunda nöqtəvi lazer işıq mənbəyini istifadə edir, fotoelektron gücləndirici tyublarda toplanan emissiya olunan fluoressensiya ilə təsvirləri qurur (Şəkil 4-18a). O sonra, üç-ölçülü konstruksiyanı yaratmaq üçün nümunədə müxtəlif dərinliklərdə bir sıra təsvirləri götürür. Nöqtəvi-skaninq konfokal mikroskop olduqca yüksək rezolyusiyalı təsvirlıəri həm iki-ölçüdə həm də üç-ölçüdə təqdim edir (Şəkil 4-19), hərçəndki onun iki kiçik məhdudiyyəti vardır. Birincisi, o hər bir fokus müstəvisini skan etmək üçün kifayət qədər uzun zaman sərf edir, ona görə də, əgər çox dinamik olan prosesin təsviri yaradılırsa mikroskop dinamikanı aşkar etmək üçün təsvirləri kifayət qədər sürətlə



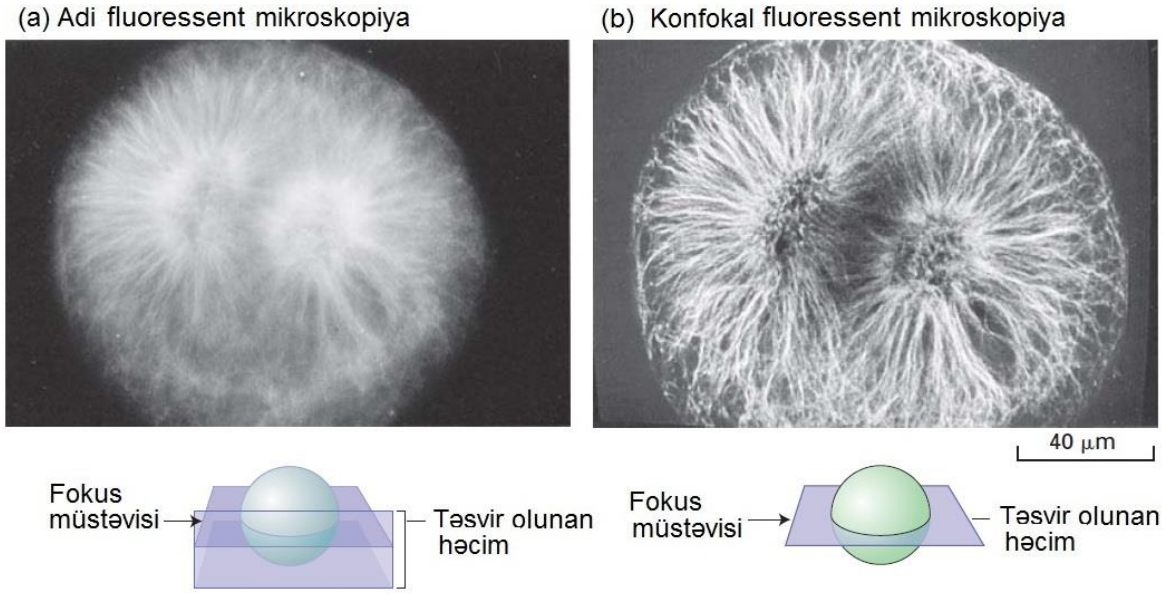
EKSPERIMENTAL ŞƏKİL 4-17 Dekonvolusiya fluoressensiya mikroskopiyası bir üç-ölçülü təsviri yaratmaq üçün bərpa oluna bilən yüksək rezolyusiyalı optik hissıləri verir. Makrofaq hüceyrələr DNT-yə (mavi), mikroborucuqlara (yaşıl) və aktin mikrofilamentlərə (qırmızı) spesifik olan fluoroxrom-nişanlanmış reagentlə rəngləndi. Hüceyrələrdə ardıcıl fokus müstəvisində (optik kəsiklər) əldə olunmuş fluoressent təsvirlərin böyük seriyası və üç-ölçüdə birləşdirilmişdir. (a) Işlənilməmiş təsvirlərin bu üç-ölçülü rekonstruksiyasında DNT, mikroborucuqlar və aktin hüceyrədə diffuziya zonası kimi aşkar olunurlar. (b) Dekonvolusiya alqoritminin təsvirlərə tətbiqindən sonra, mikroborucuqların fibrilyar təşkili və aktin adgeziyaların lokalizasiyası rekonstruksiyada asanlıqla görünə bilir. [Nəzakətlə, J. Evans, Pheno Vista Biosciences.]



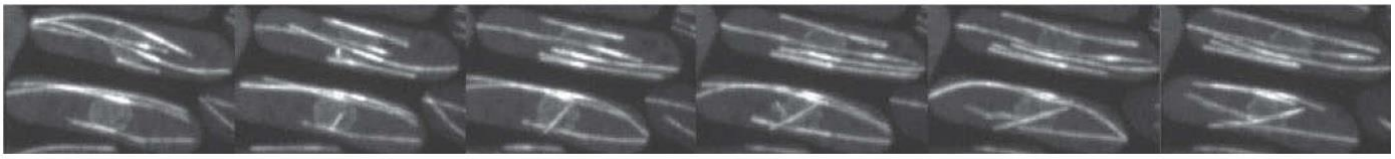
ŞƏKİL 4-18 İki tip konfokal mikroskopiyanın işıq yolları. Hər iki tip mikroskopiya ənənəvi fluoressensiya mikroskopu əsasında yığılmışdır (sarı kölgə). (a) Nöqtəvi-skanedici konfokal mikroskopunda işıq yolu. Müvafiq lazerdən alınan işığın bir dalğa uzunluğundakı işıq nöqtəsi dixroik güzgüdən əks olunaraq iki skanedici güzgüyə dəyib qayıdır (sıçrayır) və oradan da nümunədə bir nöqtəni işıqlandırmaq üçün obyektivdən keçir. Skan edən güzgülər geriyə və irəliyə elə hərəkət edirlər ki, işıq nümunəni sürətlə skan edir (nümunədəki yaşıl xətlərə bax). Nümunə tərəfindən buraxılan fluoressensiya obyektivdən keçərək geriyə qayıdır skan edən güzgülərə dəyib sıçrayaraq dixroik güzgüyə düşür. Bu döğru dar bir nöqtədən işığın irəliyə keçməsinə imkan verir. Bu dar nöqtə fokusdan kənar olan fokus müstəvilərini buraxmır, beləliklə də fotoelektron gücləndirici (photomultiplier) tyuba çatan işıq demək olar ki, yalnız fokus müstəvisindəki işıqlandırılmış rayondan gəlir. Sonra kompüter bu siqnalları qəbul edərək təsviri yaradır. (b) Skanedici fırlanan disk konfokal mikroskopunda işıq yolu. Burada, istifadə olunan iki skanedici güzgüdən istifadə etmək əvəzinə, lazerdən gələn şüa birləşdirilmiş fırlanan disklərdəki dar deşikləri işıqlandırçmaq üçün səpilir, birinci disk işığı ikinci diskdəki deşiklərdə fokus etmək üçün mikrolinzalardan təşkil olunmuşdur. Həyacanlandırma işığı, nümunədəki çoxsylı rayonları işıqlandırmaq üçün obyektivin linzasından kəsib keçir. Emissiya olunan (buraxılan) fluoressensiya obyektivin linzasından keçərək, fırlanan diskdəki deşikdən keçib geriyə qayıdır və yenidən dixroik güzgüə dəyib sıçrayış edərək həssas rəqəmsal kameraya toplanır. Diskdəki kiçik deşiklər elə düzülmüşdür ki, o fırlanır və nümunənin bütün hissələrini tez-tez bir neçə dəfə təkrar-təkrar işıqlandırır. Disk daha sürətlə firlandıqca, məsələn 3000 RPM fırlandıqca canlı hüceyrədə daha çox dinamik hadisələr yazıla bilir.

götürə bilmir. İkincisi, o hər bir ləkəni (sahəni) güclü lazer işıqla işıqlandırır, bu da əsviri çəkilən fluoroxromu ağardaraq zədələyə və canlı hüceyrəni fototoksiki zədələyə bilər, ona görə də, toplana bilən təsvirlərin sayı məhdudlaşır.

Fırlanan disk mikroskop bu iki problemin öhdəsindən gəlir (bax Şəkil 4-18b). Həyacanlanma işığı lazerdən kənara yayılır və yüksək sürətlə, məsələn 3000 rpm sürətlə fırlanan diskin kiçik bir hissəsini işıqlandırır. Faktiki olaraq disk iki əlaqəli diskdən təşkil olunmuşdur: onlardan 20000 linzası olan birinci disk lazer işığını dəqiqliklə ikinci diskin 20000 kiçik deşiklərinə yönəldir. Kiçik deşiklər elə düzülümüşdür ki, onlar nümunənin fokus müstəvisini hər dönüşdə bir neçə dəfə tam skan edir. Buraxılan fluoressent işıq ikinci diskin kiçik deşiklərindən keçərək qayıdır və dixroik güzgü vasitəsi ilə refleksiya olunuraq çox yüksək həsaslığa malik olan rəqəmsal kameraya yönəlir (fokus olunur). Bu yolla nümunələr millisaniyədən də az müddətə skan olunur və belıəliklə, fluoressent-reportyorun real-zamanda yerləşməsi hətta yüksək dinamikada belə çəkilə (tutula) bilər (Şəkil 4-20). Mikroskopun fırlanan diskinin mövcud məhduduyyəti odur ki, kiçik deşiklərin ölçüsü ümumiyyətlə dəyişməzdir və obyektivin linzasının böyütməsi ilə uyğun gəlmir, beləliklə, o əsasən 63× və ya 100× obyektivin istifadəsi üçün konfiqurasiya olunur və toxuma kəsikləri üçün tələb oluna bilən, az-böyüdülməli təsvirlərin alınması üçün az yararlı olur. Beləliklə, nöqtəvi-skanedici və fırlanan disk konfokal mikroskopları üst-üstə düşən və bir-birini tamamlayan güclü xüsusiyyətlərə malikdirlər.



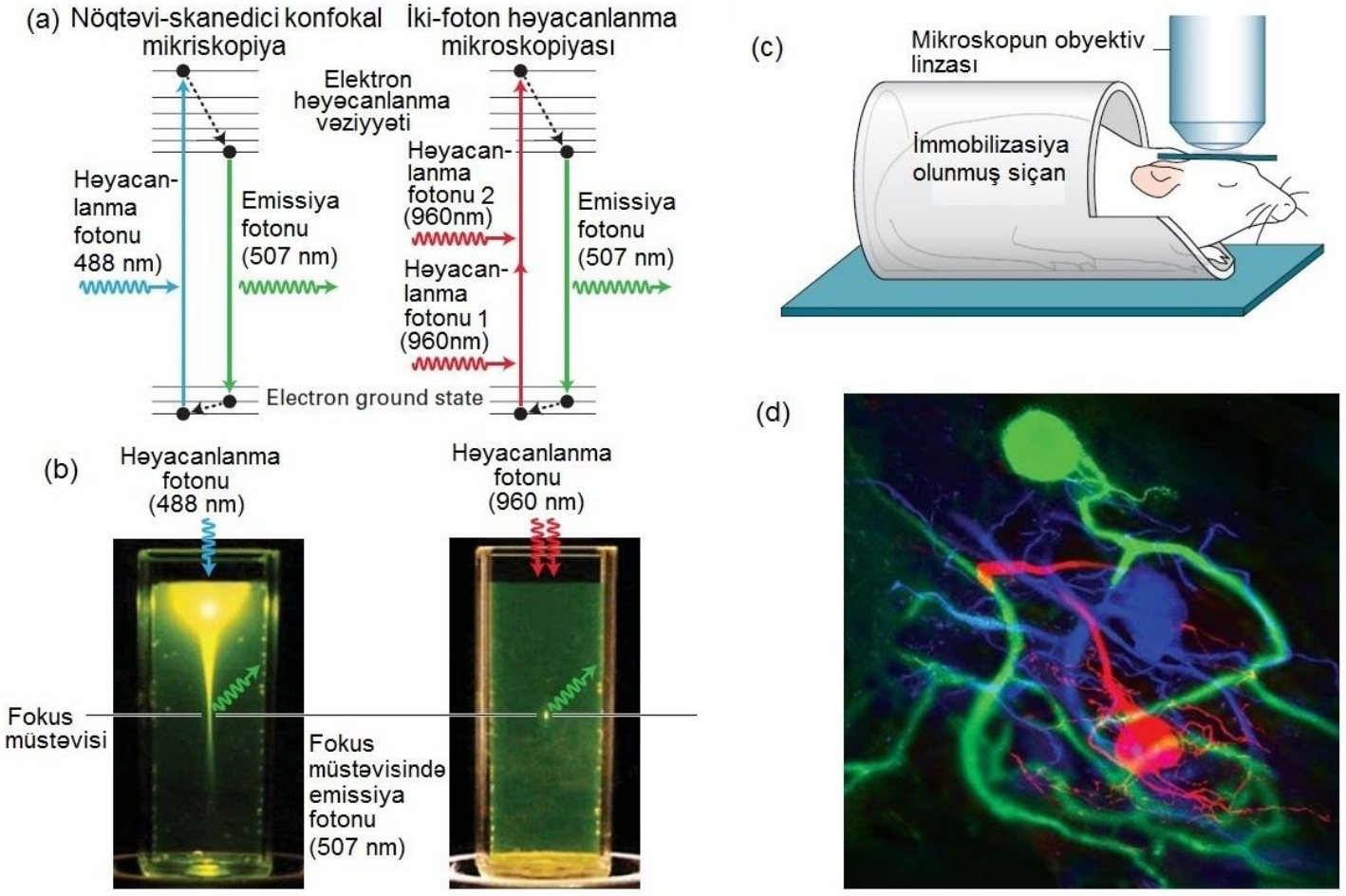
ŞƏKİL 4-19 Konfokal mikroskopiya qalın hüceyrələrlə fokusda olan optikal kəsikləri yaradır. Dəniz kirpisinin (*Psammechinus*) mitoz mayalanmış yumurtası detergentlə lizis olunmuş, anti-tubulin anticismlə təsirə məruz qoyulmuş və sonra da anti-tubulin anticismə birləşən fluoressent-yarlıklanmış anticismin təsirinə mərus qoyulmuşdur. (a) Ənənəvi fluoressent mikroskopu ilə baxıldıqda, mitoz şpindelləri bulanıq şəkildə görünür. Bu ona görə bulanıq görünür ki, eskizdə göstərildiyi kimi, fokus müstəvisindən yuxarıda və aşağıda tubulindən olan fon fluoressensiyası aşkar olunur. (b) Konfokal mikroskopunda alınan təsvir daha kəskindir, xüsusən də mitoz şpindelin mərkəzində. Bu halda, fokus müstəvisində yalnız molekullardan alınan və çox nazik optik bölmələri əmələ gətirən fluoressensiya aşkar olunur. [Mikrofotolar, 1987, J.G. White et al., 1987, *The Journal od Cell Biology*, **105**:41-48. Doi10.1083/jcb.105.1.41]



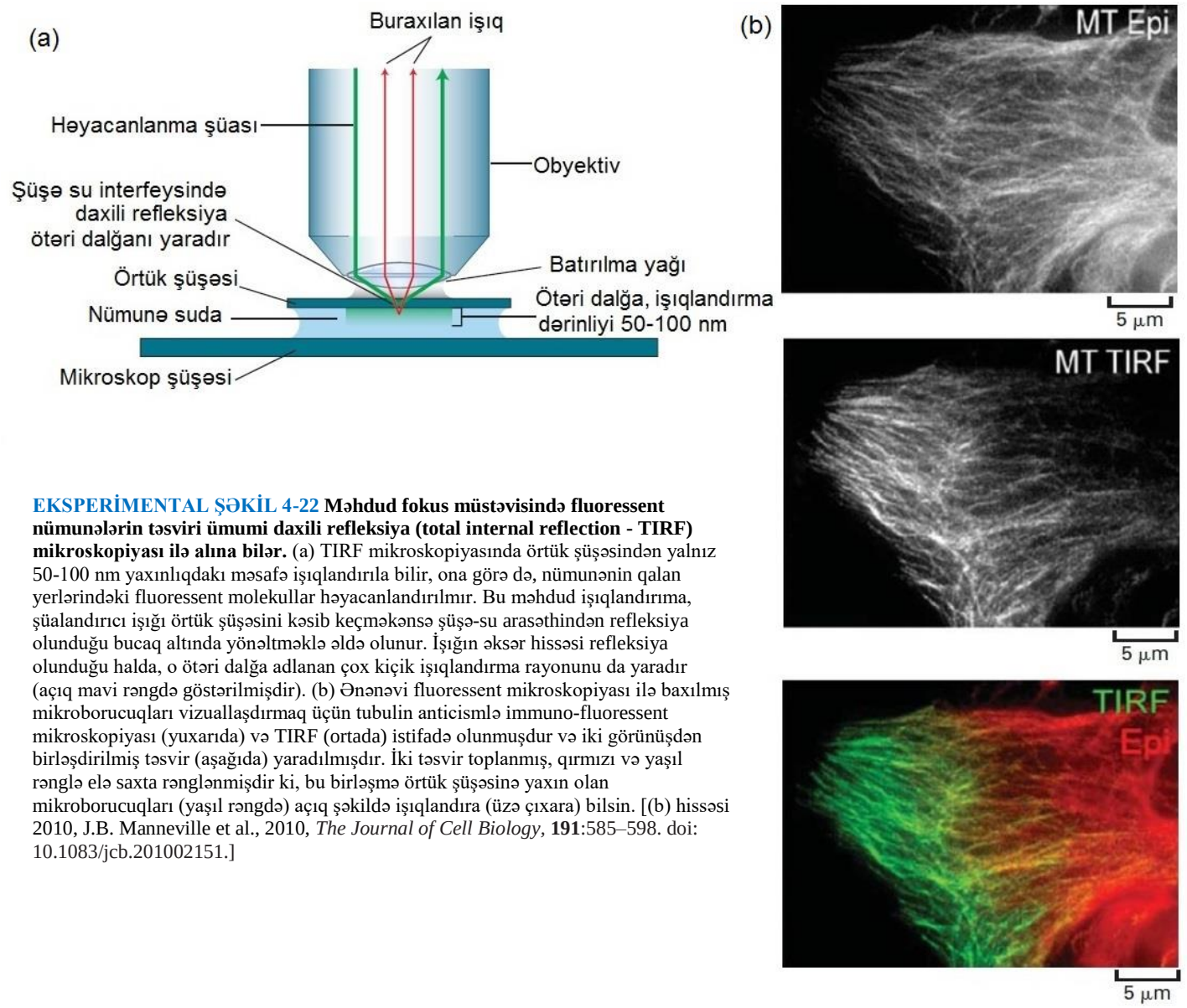
EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 4-20 Mikroborucuqların dinamikası fırlanan disk konfokal mikroskopunda təsvir oluna bilir. Bölünən mayanın iki çöpşəkilli hüceyrələrində GFP-tubulin filminin altı çərçivəsi göstərilir. [Nəzakətlə Fred Chang tərəfindən].

TIRF Mikroskopiya Bir Fokus Müstəvisində Müstəsna Təsvirləri Verir

Bizim indi yuxarıda təsvir etdiyimiz konfokal mikroskoplar çox informativ və heyranedici təsvirləri verir, amma, onlar yenə də tam mükəmməl deyillər. Alimlər xüsusi vəziyyətlər üçün optimallaşdırılmış sistemi inkişaf etdirməkdə davam edirlər. Bəzi eksperimental vəziyyətlər səthə yaxın olan nazik lokal müstəvilərdə fluoressensiya təsvirlərinin yaranmasını tələb edir, bu fokusdan-kənar fonu minimuma endirmək üçün optimal olardı. Məsələn, konfokal təsvir, hüceyrə və örtük şüşə arasında yapışma saytlarında zülalların detallarının tədqiqində və ya örtük şüşəyə yapışmış mikroborucuqların yığılma kinetkasının tədqiqində ideal deyildir. Bu vəziyyətlərin hər ikisinin təsviri yüksək həssaslıqda ***ümumi daxili refleksiya fluoressensiyası*** (*total internal reflection fluorescence* – ***TIRF***) mikroskopiyası vasitəsi ilə alına bilər. TIRF mikroskopiyanın ən çox istifadə olunan konfiqurasiyasında işığın həyacanlandırma şüaları obyektivin linzasından keçib gəlir (Şəkil 4-22a). Amma, örtük şüşədə işığın gəldiyi bucaq kritik bucaq kimi elə nizamlanır ki, işıq örtük şüşədən əks (refleksiya) olunur və obyektivdən keçərək qayıdır. Bu, *ötəri dalğa* adlanan dar bir zolağı yaradır ki, bu zaman örtük şüşəsindən yalnız 50-dən 100 nm qədər yaxınlıqda olan hissə işıqlandırılır (mikroborucuğun qalınlığından 2-4 dəfə artıq), nümunənin qalan hissəsi isə işıqlanmamış qalır. Beləliklə, əgər siz nümunənin fluoressent quruluşlarının mürəkkəb qatışığına maliksinizsə, TIRF mikroskopiyasında siz yalnız örtük şüşədən 50 nm-dən 100 nm qədər olan (mikroborucuqların qalınlığından 2-4 dəfə qalın olan) hissəni görəcəksiniz. Hüceyrələr örtük şüşə üzərində bitərkən hüceyrənin alt hissəsinin, örtük şüşəsinə daha yaxın olan hissəsinin identifikasiyasında (Şəkil 4-22b), mikroborucuqlar və aktin filamentlər kimi quruluşların yığılması və dağılması kinetikasının ölçülməsində (bax Fəsillər 17 və 18) TIRF mikroskopiya qeyri adi dərəcədə faydalı olur.



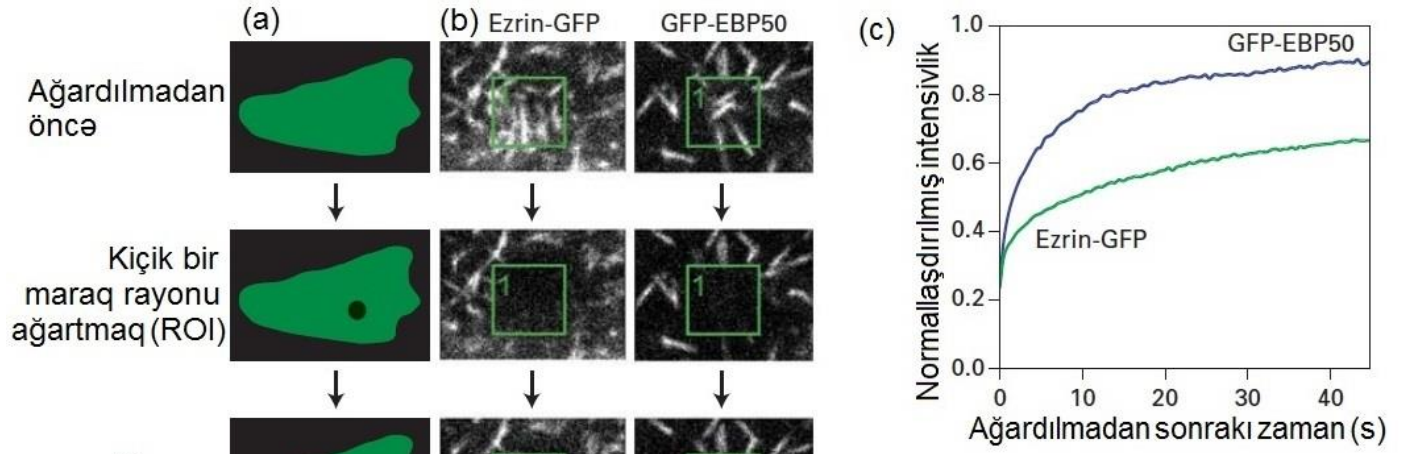
ŞƏKİL 4-21 İki foton həyəcanlanma mikroskopiyası, intravital (canlı) görüntünün dərin nüfuz etməsinə imkan yaratmaq üçün fokus müstəvisinə işıqlandırmanı məhdudlaşdırır. (a) Diaqram ənənəvi nöqtəvi-skanninq konfokal mikroskopiyada və iki-foton həyacanlandırma mikroskopiyasında istifadə edilən fərqli həyacanlanma metodlarını təsvir edir. Ənənəvi sistemdə müvafiq dalğa uzunluğunda (burada 488 nm, mavi oxla göstərilmişdir) bir fotonun udulması elektronun həyacanlanmış vəziyyətə sıçraması ilə nəticələnir. Vibrasiyalı boşalmaya getdikdən sonra (qara qırıq ox), elektron daha uzun dalğada (aşağı enerjidə), indiki halda 507 nm-də (yaşıl ox) emissiya edərək geriyə, ilkin vəziyyətinə düşür. İki-foton həyacanlanmasında, müvafiq dalğa uzunluğunda olan iki foton (burada göstərilən 960 nm, qırmızı oxlar) demək olar ki, dərhal gələr, hər ikisi udula bilir və elekttonların həyacanlanmış vəziyyətə tullanmasını induksiya edir. Əvvəlki halda olduğu kimi, elektron vibrasiyalı boşalmaya uğrayır (qara qırıq ox) və beləliklə fotonu (507 nm) emissiya etməklə geriyə, ilkin vəziyyətinə qayıdır. (b) Fluoressent material olan küvet ənənəvi konfokal mikroskopunda olduğu kimi 488 nm işıqla şüalandırılmışdır (*solda*), və ya iki-fotonlu mikroskopiyada olduğu kimi intensiv 960 nm işıqla şüalandırılmışdır. Qeyd edək ki, şərti sistem fokal müstəvidən kənarda həyacanlanmanın parlaq konusunu yaratdığı halda iki-foton həyacanlanma fokal müstəvidə yalnız bir nöqtəni işıqlandırır. (c) İki-foton mikroskopiya fluoroxromu fokus müstəvisindən kənarda həyacanlandırmadığından, o canlı heyvanda 1 mm dərinlikdə olan hüceyrələri müşahidə etmək üçün istifadə oluna bilir (intravital təsvir – canlı orqanizmdə təsvir). Canlı heyvanın təsvirini almaq üçün, o mikroskopun ştativində hərəkətsiz bərkidilməlidir və obyektivin linzasının təsvir olunan rayona yaxın gəlməsinə imkan yaradılmalıdır. (d) Lobster xərçəngin nişanlanmış neyronlarının təsviri intravital təsvirin bir nümunəsidir. [(b) hissəsi W. Zipfel et al. 2003, Macmillan Publishers Ltd: *Nature Biotechnol.* **21**:1369,hörmətlə Warren R. Zipfel tərəfindən; (d)hissəsi Peter Kloppenburg və Warren R. Zipfel nəşr olunmamış materialları.]



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 4-22 Məhdud fokus müstəvisində fluoressent nümunələrin təsviri ümumi daxili refleksiya (total internal reflection - TIRF) mikroskopiyası ilə alına bilər. (a) TIRF mikroskopiyasında örtük şüşəsindən yalnız 50-100 nm yaxınlıqdakı məsafə işıqlandırıla bilir, ona görə də, nümunənin qalan yerlərindəki fluoressent molekullar həyacanlandırılmır. Bu məhdud işıqlandırıma, şüalandırıcı işığı örtük şüşəsini kəsib keçməkənsə şüşə-su arasəthindən refleksiya olunduğu bucaq altında yönəltməklə əldə olunur. İşığın əksər hissəsi refleksiya olunduğu halda, o ötəri dalğa adlanan çox kiçik işıqlandırma rayonunu da yaradır (açıq mavi rəngdə göstərilmişdir). (b) Ənənəvi fluoressent mikroskopiyası ilə baxılmış mikroborucuqları vizuallaşdırmaq üçün tubulin anticismlə immuno-fluoressent mikroskopiyası (yuxarıda) və TIRF (ortada) istifadə olunmuşdur və iki görünüşdən birləşdirilmiş təsvir (aşağıda) yaradılmışdır. İki təsvir toplanmış, qırmızı və yaşıl rənglə elə saxta rənglənmişdir ki, bu birləşmə örtük şüşəsinə yaxın olan mikroborucuqları (yaşıl rəngdə) açıq şəkildə işıqlandıra (üzə çıxara) bilsin. [(b) hissəsi 2010, J.B. Manneville et al., 2010, *The Journal of Cell Biology*, **191**:585–598. doi: 10.1083/jcb.201002151.]

FRAP Hüceyrə Komponentlərinin Dinamikasını Aşkar Edir

Canlı hüceyrələrin fluoressent təsviri, fluoressent molekulların populyasiyasının əsas kütləsinin dinamikasını və yerləşməsini aşkar edir, amma o, fərdi molekulların dinamikasının necə olduğunu göstərmir. Məsələn, əgər biz GFP-nişanlanmış zülalın hüceyrə səthində yamaq əmələ gətirdiyini görürüksə, bu fluoressent zülal molekullarının stabil toplanmasını göstərir, yoxsa bu yamağa gələn və ondan çıxan fluoressent zülallarla dinamik tarazlığı göstərir? Biz, yamaqdakı fluoressent molekulların dinamikasını muşahidə edərək bu sualı tədqiq edə bilərik (Şəkil 4-23). Əgər biz, fluoroxromu (məsələn GFP-ni) bu yamaqda həmişəlik ağartmaq üçün yüksək intensivli işıqdan istifadə ediriksə, o zaman başlanğıcda ondan fluoressensiya gəlməyəcək və o, mikroskopda qaranlıq görünəcək. Amma, yamağın komponentləri hüceyrənin hər-hansı digər hissəsindəki ağardılmamış molekullarla dinamik tarazlıqdadırsa, o zaman ağardılmış molekullar ağardılmamış molekullarla əvəz ediləcək və fluoressensiya yenidən yaranıb bərpa olunacaq. Fluoressensiyanın bərpa olunması sürəti molekulların dinamikasının ölçüsü olacaqdır. ***Fotoağardılmadan sonra fluoressensiyanın bərpası*** (*fluorescence recovery after photobleaching* – ***FRAP***) kimi məlum olan bu metod, hüceyrə daxilində çoxsaylı komponentlərin necə dinamik olduğunu aşkar etdi. Məsələn, o, ifrazat yolunun spesifik komponentlərinin dinamikası olan membran zülallarının diffuziya əmsalının təyin olunmasında istifadə olunmuşdur (bax Şəkil 7-10). Yarlıqlanmış zülalın dinamiksının ölçülməsi üçün başqa bir yanaşmada, yaşıl işıq buraxandan qırmızı işıq buraxana qədər müvafiq dalğa uzunluqda lazerdən istifadə edərək dəyişdirilə bilən fluoressent zülalın variantları yaradılmışdır. Bu şəkildə qırmızı emissiya edən molekulların dəyişdirilmiş populyasiyasının dinamikası canlı hüceyrələrdə görünə bilər.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 4-23 Fotoağardılmadan sonra fluoressensiyanın bərpası (FRAP) molekulların dinamikasını aşkar edir. Canlı hüceyrələrdə, GFP-nişanlanmış zülalların ardınca izləmək zülalların ümumi paylanmasını öyrənməyi təmin edir, amma o fərdi molekulların dinamik populyasiyasının necə ola biləcəyi barədə xəbər vermir. (a) FRAP metodunda, GFP siqnal, *maraq rayonuna yönəlmiş* (*region of interest* – ROI) güclü lazer işığın qısa buraxılmaları (partlayışları) ilə ağardılır. İşıq molekulları sürətlə geriyə dönməyən şəkildə ağardır, ona görə də onlar yenidən aşkar olunmur. Fluoressensiyanın nahiyələrdə bərpa olunması bizə göstərir ki, ağardılmamış molekullar yenidən ROI daxilinə keçirlər. (b), Epiteli hüceyrələrinin apikal səthində mikrovillinin (ağ xətlər kimi görünən) iki komponenti EBP50 və ezrinin mübadilə dərəcəsini təyin etmək üçün FRAP istifadə edilmişdir. GFP-EBP50 və ya ezrin-GFP-ni ekspressiya edən hüceyrələrdə, kiçik nahiyədə yaşıl boksla göstərilmiş GFP ağardılmış və ardınca ağardılmamış zülallarla bərpa olunması aparılmışdır. GFP-EBP50-nin fluoressensiyası sürətlə geri qayıtmış və bu onun sürətli mübadilə dərəcəsini göstərir, halbuki ezrin-GFP-nin fluoressensiyası yavaş şəkildə geriyə qayıdır, bu da yavaş mübadilə dərəcəsini göstərir. (c) Bərpa olunmanın miqdarını tapmaqla EBP50 və ezrinin dinamik xassələrini müəyyən etmək olar. [(b) və (c) hissələri, 2012, *The Journal of Cell Biology* **198**:195-203. doi: 10.1083/jcb.201204008.]

FRET Xromoforlar Arasında Məsafəni Ölçür

Fluoressensiya mikroskopiyası, *Forster rezonans enerji ötürmə* (*Forster resonance energy transfer – FRET*) adlanan metoddan istifadə etməklə in vivo qarşılıqlı təsirdə olan iki zülalın təyin olunmasında da istifadə oluna bilir. Bu metodda iki fluoressent zülal istifadə edilir, bunların birindən ayrılan (emissiya) dalğa uzunluğu ikincinin həyacanlanma dalğa uzunluğu ilə eynidir (Şəkil 4-24). Məsələn, göy fluoressent zülal (cyan fluorescent protein – CFP) 440 nm dalğa uzunluğunda işıqla həyacanlananda, o 475 nm dalğa uzunluğunda fluoressensiya edərək işığı braxır. Əgər sarı fluoressent zülal (YFP) ona çox yaxın yerləşirsə, o 475 nm dalğa uzunluğunda işığı emissiya etmək əvəzinə GFP enerjini FRET vasitəsilə YFP-yə ötürür və FFP 530 nm işığı emissiya edir. FRET-in səmərəriliyi R^{-6}-a mütənasibdir, burada R fluoroxromlar arasındakı məsafədir – ona görədə o, yaxın məsafədə hətta ən kiçik dəyişikliyə də çox həssadır və praktikada 10 nm-dən yüksək məsafədə aşkar oluna bilmir. Beləliklə, müvafiq nümunələrin 433 nm işıqla şüalandırılması və 530 nm-də müşahidə olunması ilə, ayrılıqda CFP və YFP ilə yarlıklanan zülalların çox yaxın məsafədə olduqlarını demək olar. Məsələn, kiçik GTP-birləşdirən zülalla onun effektoru arasında siqnal ötürülməsinin hüceyrədə harada baş verdiyini təyin etmək üçün FRET sensorlar inkişaf etdirilmişdir (Şəkil 4-24b).

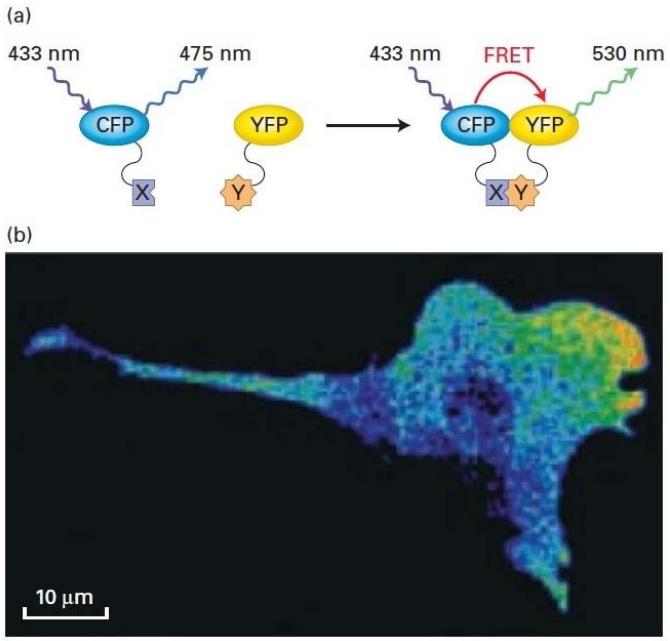
FRET-in *FRET biosensor* adlanan ağıllı tətbiqi canlı hüceyrələrdə yerli biokimyəvi mühitləri hiss etmək üçün istifadə edilə bilər. İdeya ondan ibarətdir ki, biokimyəvi siqnalı hiss edərkən konformasiya dəyişikliyinə uğrayan rayonla bir-birindən ayrılan həm CFP həm də YFP-ə malik olan tək bir polipeeptidi ekspressiya etməkdir. Siqnal olmadıqda CFP və YFP FRET-in baş verə bilməməsi qədər bir-birindən çox uzaqda

olurlar. Amma, siqnal aşkar edildikdə, konformasiya dəyişikliyi FRET-i yaratmaq üçün CFP ilə YFP-ni bir biurinə çox yaxın gətirir. Bu metodun versiyası spesifik proteinkinazaların lokal fəallığını ölçmək üçün istifadə oluna bilir. İndiki halda CFP ilə YFP arasında proteinkinazanın substratına malik olan polipeptrid rayon – *sensor domeni* – və xüsusilə fosforlaşmış substrata birləşən *liqand domeni* yerləşir (Şəkil 4-25a). Sensor domen kinaza ilə fosforlaşanda liqand domen ona birləşir və CFP ilə YFP-ni FRET-in baş veə biləcəyi qədər bir-irinə yaxın gətirir. Zülalın fosforlaşması dinamik proses olduğundan sensor domenin müvafiq fosfataza ilə defosforlaşması FRET biosensoru fəalsızlaşdıracaq. Beləliklə, FRET siqnal hüceyrəsinin fosfataza fəallığından daha çox kinaza fəallığı olan rayonlarını rəks etdirəcək. Nümunə kimi, alimlər siqnal molekulu cAMP-nin miqdarının artması ilə fəallaşan proteinkinaza A fəallığı (bax Bölmə 15.1) üçün FRET biosensoru yaradıb inkişaf etdirdilər. Proteinkinaza A biosensorunu ekspressiya edən hüceyrələrdə cAMP-nin farmokoloji yüksəlməsi FRET-i sürətlə induksiya edir (Şəkil 4-25b). Yaradıcı tədqiqatçılar bir çox fərqli yerli mühiti işıqlandırmaq üçün FRET biyosensorlarını inkişaf etdirirlər, məsələn, Ca^{2+} qatılığını və lokalizasiyasını, GTP-aza keçirici zülalların fəallaşma vəziyyətini ölçmək üçün FRET biosensorlar mövcuddur (bax Şəkil 3-32).

Super-Rezolyusiyalı Mikroskopiya Zülalların Yerləşməsini Nanometr Dəqiqliklə Aşkar Edəbilir

Bizim əvvəldə müzakirə etdiyimiz kimi, fluoressensiya mikroskopunun nəzəri imkan məhdudiyyəti təxminən 0.2 µm-dir (200 nm). Ümumilikdə *super-rezolyusiyalı mikroskopiya* kimi məlum olan iki əsas yanaşma bu məhdudiyyətdən keçmək üçün yaradılıb inkişaf etdirilmişdir. Birinci tip yanaşmada işıqlandırma işığı yüksək rezolyusiyalı təsvirin alınması istiqamətində qurulmuşdur. *Quruluş yaradan işıqlandırma mikroskopiyasında* (*structured illumination microscopy –SIM*) nümunə işığın forması ilə və qaranlıq zolaqlarla işıqlandırılır və işıqlandırma forması Moir barmaqları əmələ gətirmək üçün fırladılanda bir sıra təsvirlər götürülür. Təsvirlərin kompüter analizləri, nüvə qabığının bir hissəsinin mikrofotosunda göründüyü kimi, adi konfokal mikroskopdan iki dəfə artıq rezolyusiya – 100 nm rezolyusiya verir (Şəkil 4-26a). SIM canlı hüceyrələrin təsvirinin alınması üçün xüsusilə əlverişlidir, belə ki, hər 4 saniyədən bir üç-ölçülü təsvirlər alına bilir. *Stimullaşmış emissiya parçalanması* (*stimulated emission depletion – STED*) mikroskopiyasında nümunə nöqtəvi-skanedici mikroskopiyada olduğu kimi skan olunur, amma çox əhəmiyyətli bir fərqlə: fokus olunan həyəcanlanma lazer nöqtəsi ponton-şəkilli "tükəndirmə şüası" ilə əhatə olunur və effektiv şəkildə həyacanlandırma sahəsini daha çox kiçik edir. Kompüter həyəcanlandıran ləkənin dəqiq yerini və onun buraxdığı emissiyanı yaza bildiyindən, o optimal 30 nm-lik rezolyusiyanı verən təsirli görüntünü yarada bilir, məsələn aktin liflərinin təsvirində olduğu kimi, bu təsvirin detallarını böyük ölçüdə artırır. (Şəkil 4-26b).

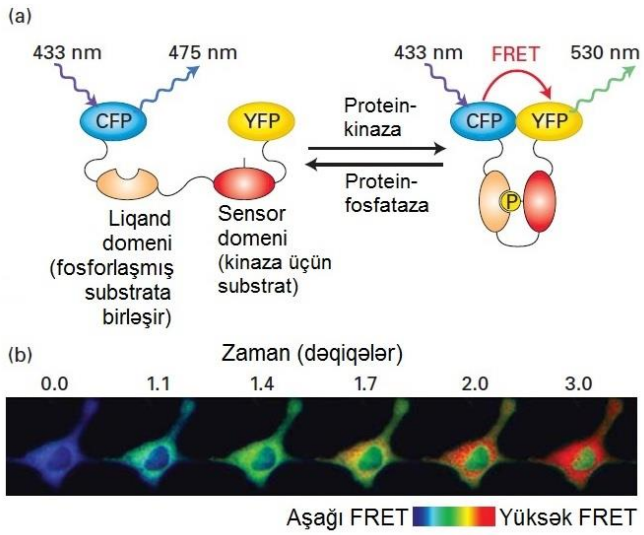
İkinci əsas yanaşmada tək-molekulun aşkarlanması və lokalizasiyası istifadə edilir. Bunun necə baş verdiyini anlamaq üçün bir-birindən 75 nm məsafədə ayrılmış fluoressent ləkələri təsəvvür edin. Siz onların təsvirini yaratmağa çalışarkən, onların hər biri fluoressensiyanın Qaussian paylanmasını yaradır, bunlar



ŞƏKİL 4-24 Zülal-zülal qarşılıqlı əlaqələri FRET vasitəsi ilə vizuallaşdırıla bilər. FRET-in istifadə olunma ideyası iki fərqli fluoressent zülalın istifadəsinə əsaslanmışdır, onlardan biri həyacanlananda onun buraxdığı (emissiya) işıq onun kifayət qədər çox yaxın olduğu tətbiq olunan ikinci fluoressent zülalı həyacanlandırır (yuxarı panel). (a) Bu nümunədə, göy fluoressent zülal (CFP) X zülalına qovşaq olunmuşdur, sarı fluoressent zülal (YFP) isə Y zülalına qovşaq olunmuşdur, hər iki zülal canlı hüceyrədə ekspressiya olunmuşlar. Əgər hüceyrə 433 nm işıqla işıqlandırılarsa GFP 475 nm-də fluoressent işıq siqnalı buraxacaq. Əgər YFP ona yaxın yerləşməmişsə (*solda*), enerji ötürülməsi baş verməyəcək və uyğun olaraq 530 nm-də emissiya (fluoressensiya) olunmayacaq. Amma, əgər X zülal Y zülalla qarşılıqlı əlaqədədirsə (*sağda*), o CFP ilə YFP-ni bir-birinə yaxınlaşdıracaq, buraxılan 480 nm işıq enerjisi FRET vasitəsilə YFP-ə ötürüləcək və YFP 530 nm dalğa uzunluqda emissiya edəcək. (b) Bu siçan fibroblastında, FRET fəal tənzimləyici zülal (Rac) ilə onun birləşdiyi partnyor arasındakı qarşılıqlı əlaqənin miqrasiya edən hüceyrənin ön tərəfində yerləşdiyini aşkar etmək üçün istifadə olunmuşdur. [(b) hissəsi 2003, R.B. Sekar and Periasamy, 2003, *The Journal ofCell Biology* **160**:629, doi: 10.1083/jcb.200210140.]

o qədər çox üst-üstə düşürlər ki, bir ləkə kimi görünürlər. Amma, əgər siz hər bir ləkənin təsvirini fərdi olaraq yarada bilsəz və Qaussian qövsün mərkəzini tapa bilsəz, rezolyusiya limitini "tuta" bilərsiz və bir-birindən 75 nm aralı ləkələri aşkar edə bilərsiz. Bunu edtməyin bir yolu *fotofəallaşmış lokalizasiya mikroskopiyası* (*photo-activated localization mikroskopy – PALM*) adlanır və GFP-nin variantının fotoafəallaşdırılması qabiliyyətinə əsaslanır və yaxud, o yalnız həyacanlandırma dalğa uzunluğundan fərqli olan spesifik dalğa uzunluqlu işıqla fəallaşamda fluoressent ola bilir. Bizim yalnız bir GFP molekulunu fəallaşdıra bildiyimiz halda nə baş verə biləcəyini nəzərə alaq. Biz sonra nümunəni həyacanlandıranda, fəallaşan bir GFP bir neçə yüz foton buraxır və Qaussian paylanmasının yaranmasına səbəb olur (Şəkil 4-26c). Baxmayaraq ki, hər bir fotonun analizi GFP-nin harada olmasını dəqiq demir, amma pikin mərkəzi bizə nanometr dəqiqliyi ilə GFP-nin harada yerləşdiyini deyə bilir. Əgər biz indi başqa bir GFP-ni fəallaşdırsaq, biz fərdi olaraq onun yerini eyni dəqiqliklə tapa bilərik. PALM-da, GFP-lərin kiçik faizi fəallaşır və onların lokalizasiyası yüksək dəqiqliklə müəyyən edilir və sonra, GFP-

lərin digər bir dəsti fəallaşdırılır və lokalizasiya olunur, fəallaşmanın və lokalizasiyanın əlavə tsiklləri yazıldıqda yüksək rezolyusiyalı təsvir alınır. Məsələn, mikroborucuqların üç-ölçülü paylanması adi fluoressent mikroskopiya metodu ilə müqayisədə daha çox yüksək təmizliklə görünə bilir (Şəkil 4-26c). Bu tipli təsvirlərin alınması kifayət qədər çox zaman aparır, ona görə də, onların canlı hüceyrələrdə istifadəsi çox məhduddur. Bütün bunlara baxmayaraq, super-rezolyusiyalı mikroskopiyannın böyük üstünlüklərinə görə onun həssaslığının, sürətinin və fəza rezolyusiyasının yaxşılaşdırılmasına çox böyük cəhdlər edilir və bu yanaşmanın inkişafında çox böyük və sürətli tərəqqini gözləyirik.

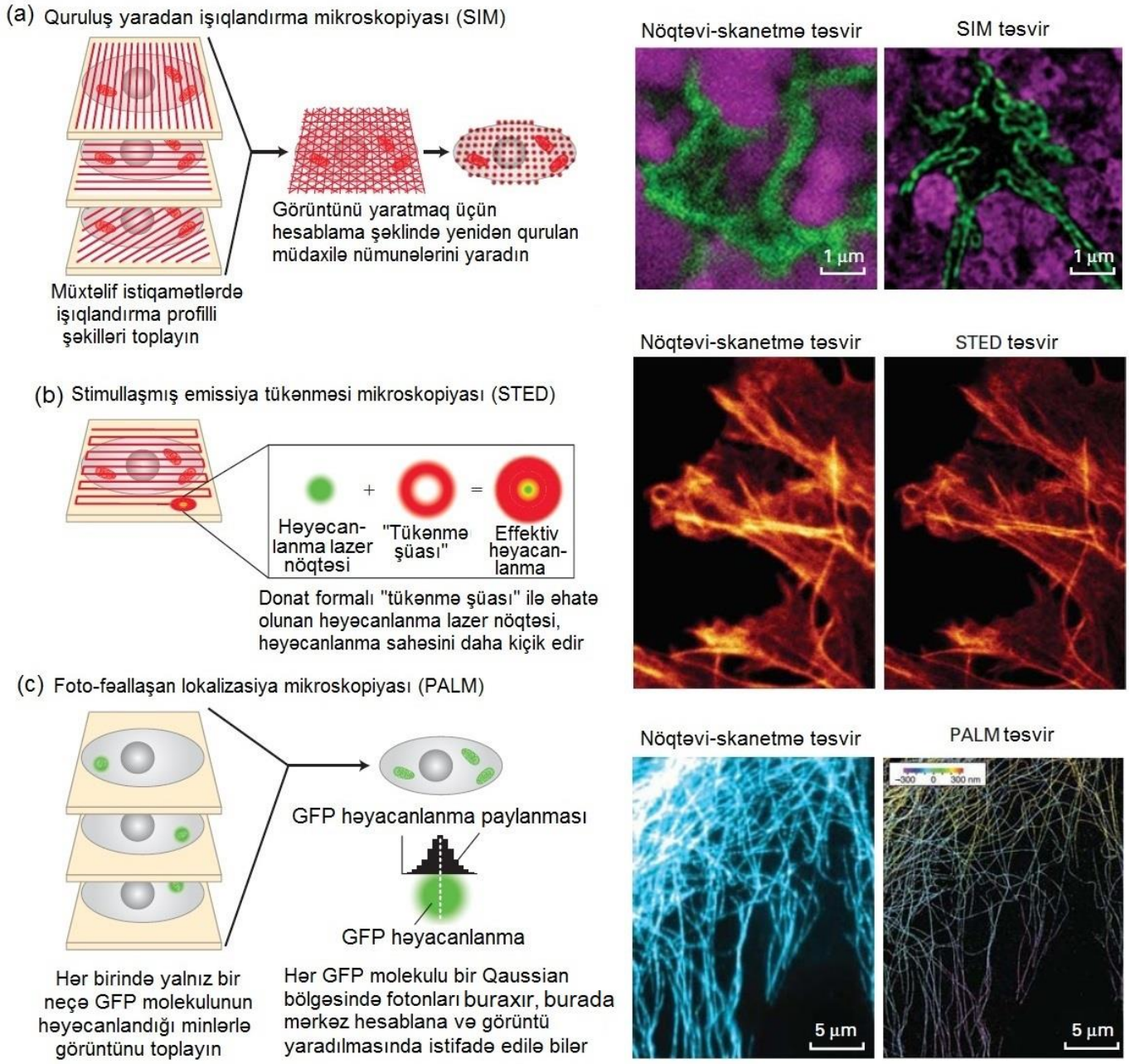


EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 4-25 FRET biosensorlar lokal biokimyəvi mühitləri aşkar edə bilir. (a) FRET biosensor, tədqiq olunan ətraf mühitə həssas olan rayonlarla əlaqələnən iki fluoressent zülala malik olan qovşaq zülaldır. Bu misalda, zülal konstrukt spesifik kinaza ilə fosforlaşa bilən xüsusi ardıcıllığa malik olan rayonla ("sensor domeni") və fosforlaşarkən sensor domenə birləşmiş rayon ("linker domeni") vasitəsilə YFP ilə əlaqələnmiş CFP-dən ibarətdir. Kinaza fəallığı olmayanda, iki fluoressent zülal FRET-in baş verə bilməsi üçün bir-birindən çox uzaqdadırlar, amma, lokal olaraq fəal kinaza ilə fosforlaşanda liqand domen ona birləşir, CFP ilə YFP-ni bir-birinə kifayət qədər yaxın gətiri və FRET baş verir. Sensor həmçinin ona birləşmiş fosfatı ondan uzaqlaşdıran müvafiq fosfataza ilə qarşılaşdıqda fəalsızlaşa bilir. Beləliklə biosensor lokal mühitdə kinaza və fosfataza fəallığının nisbəti bardədə məlumat verir. (b) Proteinkinaza A üçün FRET biosensorun istifadəsinə aid nümunə cAMPnin yüksəlməsi ilə fəallaşmasıdır. Bu nümunədə, t = 0 olanda cAMP-nin yaranmasını induksiya edən dərman froskolin hüceyrələrə əlavə edilmişdir və bundan etibarən müxtəlif vaxtlarda təsvirlər alınıb toplanmışdır. Təsvir fəal kinazanın lokalizasiyasını və fəallaşma dərəcəsini göstərir. [(b) hissəsi J. Zhang et al., 2001, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **98**:14997–15005. © 2001 National Academy of Sciences, U.S.A.]

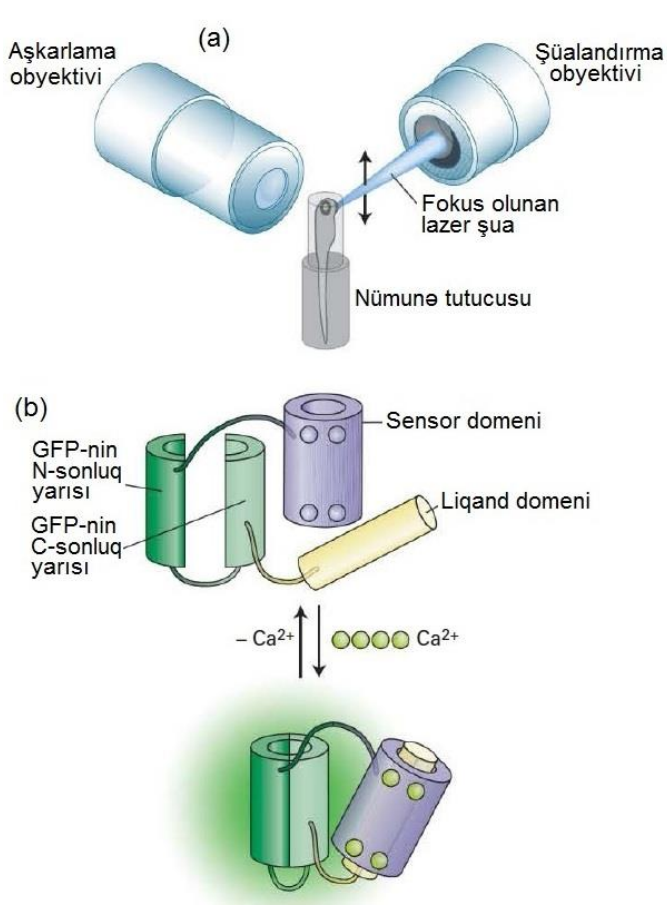
İşıq-Təbəqə Mikroskopiyası Hüceyrələri Canlı Toxumada Tez Şəkildə Təsvir Edir

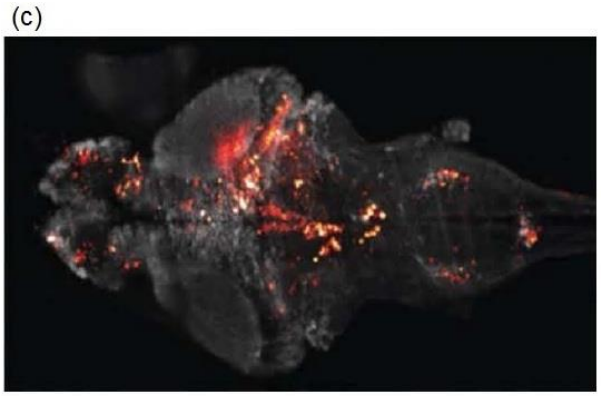
Bizim yuxarıda müzakirə etdiyimiz konfokal təsviretmə yanaşmalarının çoxu eyni obyektiv linza ilə fluoroxromları işıqlandırır və aşkar edir, nümunənin həyacanlandırılması və emissiya olunan fluoressensiyanın təsvirinin alınması eyni fokus müstəvisində baş verir. Bu yanaşma nəticəsində, təsvir oluna bilən nümunənin dərinliyində məhdudiyyətlər vardır. Son zamanlar bu məhdudiyyətin azaldılması üçün yeni texnologiya inkişaf etdirilmişdir. *İşıq-təbəqə mikroskopiyasında* nümunə yandan işıqlandırılır və ortoqnal istiqamətdə baxılır (Şəkil 4-27a). Fokus olunmuş lazer şüa geriyə qaytarılır və nümunənin ortasından keçməyə məcbur edilərək tək müstəvini işıqlandırır. İşıqlanan müstəviyə düz bucaq altında olan aşkarlama obyektivi nümunənin təsvirini çəkir. Üç-ölçülü təsviri yaratmaq üçün nümunədəki bütün müstəvilərin təsviri çəkilməlidir. Bu, təsvirlər yığınını yaratmaq üçün, işıqlandırıcı təbəqəni və aşkarlama obyektivini nümunə vasitəsilə koordinasiya olunmuş şəkildə keçməklə əldə edilir, daha sonra kompüter vasitəsilə üç ölçülü təsviri yığmaq olur.

Bu texnologiyanın istifadə edildiyi bir nümunədə alimlər zebrafişin canlı beyin hüceyrələrində Ca^{2+} qatılığının təsvirini yaratdılar. Zebrafiş beynində neyronları, Ca^{2+} mövcud olmadıqda fluoressensiya edə bilməyən, amma mövcud olduqda edə bilən kimi dizayn olunmuş GFP əsaslı GCaMP adlanan Ca^{2+} biosensorlarını ekspressiya etməyə hazırladılar (Şəkil 4-27b). Bu biosensor, N- və C-sonluq domenləri birləşmiş, amma zülalın ortası qırılmış olan GFP-dən təşkil olunmuşdur və Ca^{2+} sensor domeni bir uca qoşulmuş, iqand domen isə başqa uca qoşulmuşdur. GFP-nin quruluşu qırıldığından (fasiləli olduğundan) zülal müvafiq dalğa uzunluqlu işıqla işıqlandırılanda fluoressensiya etmir. Sensor domen kiçik Ca^{2+}-birləşdirən zülal kalmodulindən trəmişdir (bax Şəkil3-31), o Ca^{2+} ilə birləşəndə sensor domenin konformasiyasını dəyişir. Liqand domeni hədəf ardıcıllığıdır və kalmodulin Ca^{2+} ilə birəşərək fəallaşanda bu domenə birləşir. Fəal kalmodulin liqand domeninə birləşəndə o qırılmış GFP-nin konformasiyasını elə dəyişir ki, o həyacanlana və fluoressensiya edə bilir. Bu yolla, Ca^{2+} səviyyəsi kalmodulini fəallaşdırmaq üçün kifayət qədər qalxdığı zaman fluoressent siqnalın yaranması müşahidə edilir. Fəsil 22-də müzakirə etdiyimiz kimi, neyronlar əlaqə yaradanda bu əlaqənin bir hissəsi Ca^{2+} səviyyəsinin artması ilə baş verir. Bu sinir əlaqələrinin incə təsviri zebrafişin GCaMP ekspressiya edən beyinində in vivo işıq-təbəqə mikroskopiyası yolu ilə alına bilər (Şəkil 4-27c).



KSPERİMENTAL ŞƏKİL 4-26 Super-rezolyusiyalı mikroskopiya işıq mikroskopu təsvirlərini nanometr dəqiqliyi ilə yarada bilir. İşıq mikroskopunun nəzəri rezolyusiyası Super-rezolyusiyalı mikroskopiya ilə altüst olunur. (a) Quruluş yaradan işıqlandırma mikroskopöiyasında (SIM) nümunə işıq və qaranlıq zolaqların profili ilə işıqlandırılır və hər bir işıqlandırma dövrəsində bir neçə təsvir götürülür. Bu metod yüksək rezolyusiyalı təsvirləri almaq üçün riyazi olaraq rekonstruksiya oluna bilən interferensiya formasını yaradır. Sağdakı təsvirlər nüvənin ənənəvi nöqtəvi-skanedici konfokal mikroskopiyası və SIM ilə alınmış təsvirindəki oxşar sahələri (lamin, yaşıl; DNT, tünd qırmızı) göstərir və rezolyusiyanı təxminən iki dəfə yüksəldir. (b) Stimullaşmış emissiya dağılması mikroskopiyasında (STED) nümunə nöqtəvi-skanedici konfokal mikroskopiya kimidir, amma işığın emissiya lazeri ilə yaradılmış və pişi-şəkilli stimullaşmış dağılma zonası ilə məhdudlaşan çox kiçik nöqtəsində skan olunur. Sağdakı nümunələr aktin liflərinə görə rənglənmiş və nöqtəvi-skanedici mikroskopiya və STED ilə təsviri alınmış hüceyrə hissələrini göstərir. (c) Fotofəallaşmış lokalizasiya mikroskopiyasında (PALM) istifadə üçün həyacanlandırma dalğa uzunluğundan fərqli dalğa uzunluğu ilə fotofəallaşan GFP variantı yaradılmışdır. Kiçik sayda GFP molekulu fəallaşdırılıb sonra da həyacanlandırılarkən onların hər biri toplanıla bilən minlərlə fotonu buraxacaq (emissiya edəcək). Bu, mərkəzi emissiya edən GFP-nin yerləşdiyi tərəf ətrafında olan, Qaussian əyrisini yaradır, bu mərkəz GFP-nin yerləşməsinin təyinini nanometr dəqiqliyi ilə təmin edir. Başqa GFP molekullarını həyacanlandırmaq üçün bu proses yüzlərlə dəfə təkrar olunur, və yüksək-rezolyusiyalı təsvir meydana gəlir. Sağ tərəfdə mikroborucuqların konfokal təsviri müvafiq super-rezolyusiyalı təsvirlə müqayisə olunur, burada mikroborucuqların üç-ölçülü düzülüşü rənglə kodlaşdırılır. [(a)-dakı mikrofoto Schermelleh et al., 2008, *Science* **320**:1332–1336-dan; (b)-dəki Dr. Elise Stanley, Toronto Western Research Institute; (c) hissəsi B. Huang et al., 2008, *Science* **319**:810–813.]





ŞƏKİL 4-27 İşıq-təbəqə mikroskoiyası canlı toxumada sürətlə baş verən hadisələrin təsvirini çəkir. (a) İşıq-təbəqə mikroskoiyasında işığın təbəqəsini almaq üçün toxuma nümunəsi nümunəni skan edən fokus olunmuş lazer şüası ilə işıqlandırılır. Nümunə aşkaredici obyektiv vasitəsilə ortoqonal istiqamətdə müşahidə edilir. Üçölçülü təsviri almaq üçün işıqlandırıcı və aşkaredici obyektivlər koordinasiya olunmuş şəkildə hərəkət etdirilir, nümunənin dərinliklərindən təsvirlər çəkilir. (b) GCaMP kimi məlum olan Ca^{2+} biosensor. Bu biosensor GFP-nin N- və C-sonluqlarının qovşaq olunduğu və ortasından qırıldığı polipeptidi yaratmaq üçün rekombinant DNT texnologiyasından istifadə edərək hazırlanmışdır. Qırığın bir tərəfində Ca^{2+}-birləşdirən kalmodulindən ibarət olan sensor domen yerləşir. Digər tərəfindəki isə hədəf ardıcıllıından təşkil olunmuş liqand domendir, Ca^{2+} mövcud olanda bu ardıcıllığa kalmodulin birləşir. Ca^{2+} mövcud olmayanda fasiləyə görə GFP funksional olmur. Ca^{2+} mövcud olanda kalmodulin Ca^{2+} ionlarına birləşir və konformasiya dəyişikliyinə uğrayır, bu da onun liqand domeninə birləşməsinə imkan verir. Bu konformasiya dəyişikliyi GFP-nin iki hissəsini bir-birinə o qədər yaxın gətirir ki, bu fluoressent zülal funksional olur. (c) Canlı zebrafiş beyn hüceyrələrində yalançı qırmızı rənglənmiş Ca^{2+} keçidilər. [(c) hissəsi M. B. Ahrens et al., 2013, *Nature Methods* **10**:413–420-dən.]

4.2 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSİYALARI

İşıq Mikroskopu: Hüceyrə Quruluşunun Tədqiqi və Hüceyrə Daxilində Zülalların Vizuallaşması

- İşıq mikroskopunun imkanları (rezolyusiyası), işığın təxminən 0.2 μm dalğa uzunluğu ilə məhdudlaşır.
- Sınma göstəricisindəki fərqlər faza-kontrast və birbaşa interferensiya-kontrast mikroskopiyalardan istifadə edərək tək hüceyrələrin hissələrini müşahidə etmək üçün istifadə edilə bilər.
- Toxumalar əsasən fiksasiya olunmalı, kəsiklərə ayrılmalı, hüceyrələrə görə rənglənməli və subhüceyrə quruluşları müşahidə olunmalıdır.
- Fluoressensiya mikroskopu, işığı bir dalğa uzunluğunda udan və daha uzun dalğa uzunluğunda buraxan (emissiya edən) birləşmələri istifadə dir.
- İona-həssas fluoressent boyalar Ca^{2+} kimi ionların hüceyrədaxili qatılığını ölçə bilir.
- İmmunofluoressent mikroskopiya, fiksasiya olunmuş və keçiriciliyi təmin olunmuş hüceyrələrdə spesifik komponentlərin yerini təyin etmək üçün anticismlərdən istifadə edir.
- Dolayı immunofluoressent mikroskopiya nişanlanmamış birinci anticismləri istifadə edir, ardınca da, birinci anticismi tanıyan və onun yerinin taninmasına imkan verən nişanlanmış ikinci abticismlərdən istfadə edir.
- Epitop yarlıqları kodlaşdıran qısa ardıcıllıqlar, epitop yarlıqa-spesifik anticismdən istifadə edərək ekspressiya olunan zülalın yerini təyin etmək üçün zülal kodlaşdıran ardıcıllıqlara birləşdirilə bilər.
- Yaşıl Fluoressent zülal (GFP) və onun törəmələri təbii yaranmış fluoressent zülallardərlar.

- GFP-nin maraq zülalına qovşağı, canlı hüceyrələrdə onun lokalizasiyasının və dinamikasının öyrənilməsinə imkan verir.
- Dekonvolyusiya və konfokal mikroskopiya fokusdan kənar fluoressent işığı kənarlaşdıraraq fluoressent təsvirlərdə xeyli dərəcədə aydınlığı təmin edir.
- Ümumi daxili refleksiya (TIRF) mikroskopiyası örtük şüşəsinə yaxın olan fluoressent nümunələrin yüksək təmizlikdə görünmələrinə imkan verir.
- Fotoağardılmadan sonra fluoressensiyanın bərpası (FRAP) molekulların populyasiyasının dinamikasının analiz olunmasına imkan verir.
- Forster rezonans enerji ötürülməsi (FRET), zülallar bir-birinə çox yaxın olanda işıq enerjisinin bir fluoressent zülaldan digərinə ötürülməsinə əsaslanan metod olub hüceyrədə iki molekulun bir-birinə çox yaxın olduğunu aşkar etməyə imkan verir.ın
- Super-rezolyusiyalı mikroskopiya ətraflı fluoressent təsvirlərin nanometr dəqiqliyində alınmasına imkan verir.
- İşıq-təbəqə mikroskopiyası fluoressnt nümunələri işıq təbəqəsi ilə yandan işıqlandırmaqla qalın nümunələrin təsvirlərini təmin edə bilir.

4.3 Elektron Mikroskopu: Yüksək Rezolyusiyalı Təsvirlərin Alınması

Tək bir zülal, orqanoid, hüceyrə və toxuma kimi, bioloji nümunələrin elektron mikroskopu ilə təsviri işıq mikroskopu ilə alına biləcəyindən daha yüksək rezolyusiyalı ultraquruluş təsvirlərini təmin edə bilir. Elektronların qısa dalğa uzunluqları o deməkdir ki, elektron mikroskopunda transmissiya üçün rezolyusiyanın məhdudluğu nəzəri olaraq 0.005 nm (bir atomun diametrindən az) və ya işıq mikroskopunun rezolyusiyasından 40000 dəfə və "köməksiz" insan gözündən 2 milyon dəfə üstündür. Amma, bioloji sistemlərin tədqiq olunmasında transmissiya elektron mikroskopunun daha effektiv rezolyusiyası bu idealdan əhəmiyyətli dərəcədə az olur. Optimal şərait altında, 0.10 nm rezolyusiya transmissiya elektron mikroskopları vasitəsi ilə alına bilər, bu ənənəvi yüksək rezolyusiyalı işıq mikroskoplarından təxminən 2000 dəfə, müasir super-rezolyusiyalı mikroskopdan 300 dəfə yaxşıdır.

Elektron mikroskopunun fundamental prinsipləri işıq mikraskopunun prinsiplərinə oxşayır, əsas fərq ondan ibarətdir ki, eloktron mikroskoplarında elektromaqnit linzalar, optikal linzaların istifadə etdiyi görünən işıq əvəzinə yüksək sürətli elektron şüalarını fokus edir. *Transmissiyalı elektron mikroskopunda* (*TEM*), elektronlar filamentdən buraxılır və elektrik sahəsində sürətləndirilir. Kondensator linzası elektron şüalarını nümunə üzərinə cəmləyir, obyektiv və proyektorun linzaları nümunəni və proyekti kəsib keçən elektronları cəmləyir (fokus edir) və onları görünmə ekranına və ya başqa detektora yönəldir (Şəkil 4-28, *solda*). Atomlar havada elektronları adsorbsiya etdiyindən, elektron mənbələri arasındakı tam boru və detektor ultrayüksək vakum altında saxlanılır. Beləliklə, canlı materiala elektron mikroskopu ilə baxıla bilmir.

Bu bölmədə biz, elektron mikroskopu ilə bioloji materialları görmək üçün müxtəlif fərqli yanaşmaları təsvir edirik. Daha geniş istifadə olunan alət transmissiya elektron mikroskopudur, amma, *skanedici elektron mikroskopu* (*SEM*) da çox istifadə olunandır və bu bölmənin sonunda müzakirə etdiyimiz kimi bir-birini tamamlayan məlumatı verir (Şəkil 4-28, *sağda*).

Tək Molekullar və ya Quruluşlar Mənfi (Neqativ) Rəngləmə və ya Metal Kölgələmədən İstifadə etməklə Təsvir Oluna Bilir

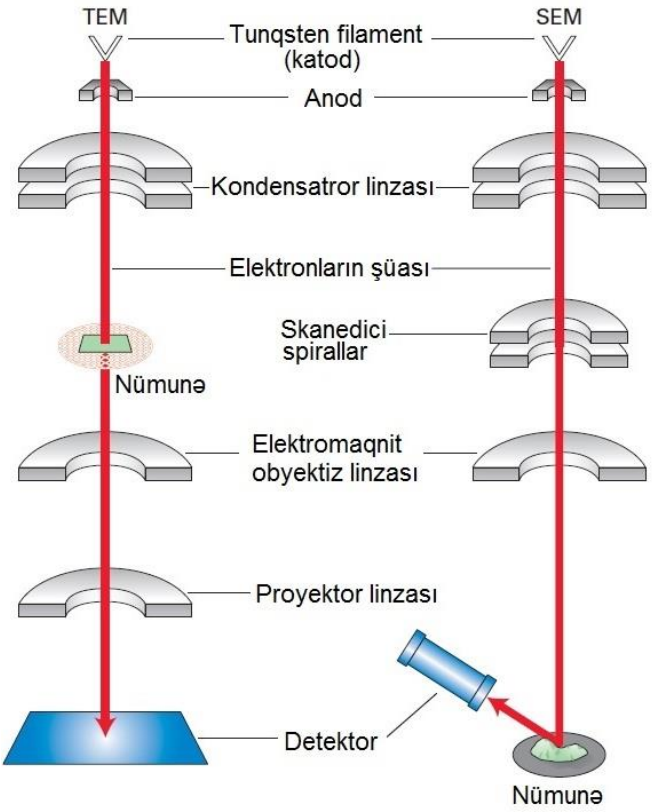
Adətən biologiyada zülal və ya nuklein turşuları kimi tək makromolekulların və ya virus və sitoskelet əmələ gətirən filamentlər kimi quruluşların dəqiq forması geniş tədqiq edilir. Bunlara transmissiya elektron mikroskopunda baxmaq nisbətən asandır o şərtlə ki, onlar gələn elektronları səpən ağır metalla rənglənsinlər. Nümunəni hazırlamaq üçün, o əvvəlcə nazik plastik və ya karbon filmlə örtülmüş 3 mm-lik *elektron mikroskopu toruna* (Şəkil 4-29a) adsorbsiya olunur. Sonra, nümunə uranil asetat kimi ağır metal məhluluna batırılır, məhlulun artığı uzaqlaşdırılır (Şəkil 4-29b). Bu prosedur nəticəsində uranil asetat toru örtür, lakin nümunələr yapışdırılmış rayonlar istisna olunur. Biz nümunəyə TEM-də baxarkən rənglənmənin istisna olunduğu rayonları görürük, beləliklə, nümunəyə *mənfi (neqativ) rənglənmiş* deyilir. Rəngləmə nümunənin topologiyasını dəqiqliklə aşkar edə bildiyindən yüksək rezolyusiyalı təsvir əldə oluna bilər (Şəkil 4-29c).

Nümunələr *metal kölgələmə* ilə də hazırlana bilir (Şəkil 4-30). Bu metodda, nümunə adsorbsiya olunur sonra da, metalı buxarlandırmaqla nazik platin filmlə örtülür, ardınca da nümunə turşu və ya ağardıcı (bleach) ilə həll edilir, platin örtük (replika kimi məlum olan) qalır. Platinlə örtülmə müəyyən bir sabit bucaqdan və ya nümunə fırlanarkən kiçik bucaq altından aparıla bilər, bu zaman ona *aşağı bucaq fırlanann kölgələməsi* deyilir. Nümunə tora köçürüləndə, və TEM ilə tədqiq olunanda bu metod nümunənin üç-ölçülü topologiyası barədə informasiyanı verir.

Hüceyrə və Toxumalar Elektron Mikroskopiyasında Baxmaq Üçün Nazik Kəsiklərə Ayrılır

Tək hüceyrələr və toxuma hissələri standard transmissiyalı elektron mikroskopunda baxılmaq üçün çox qalındırlar. Bu problemi həll etmək məqsədi ilə hüceyrə və toxumanın *nazik kəsiklərini* hazırlamaq üçün metodlar işlənib hazırlanmışdır. Bu kəsiklər elektyron mikroskopunda tədqiq olunarkən, hüceyrənin daxili təşkilinin gözəlliyi və tamlığı aşkar edilmiş və bu hüceyrə biologiyasında bir inqlab olmuşdur – ilk dəfə olaraq yeni orqanoidlər və sitoskelet barədə ilk biliklər meydana gəlmişdir.

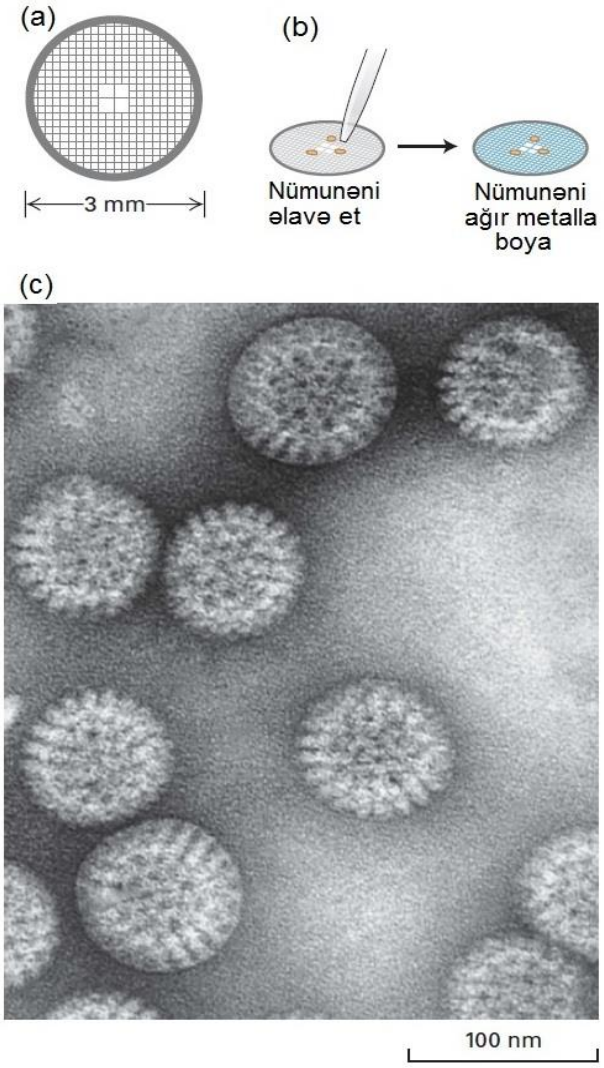
Nazik kəsikləri hazırlamaq üçün, nümunəni kimyəvi fiksasiya etmək, onu dehidrasiya etmək, onu bərkidən (pleksiqlass kimi) maye plastiklə hopdurmaq lazımdır və sonra da, 5-dən 100 nm-qədər qalınlıqda kəsiklərə ayırmaq lazımdır. Görünməli olan quruluşlar üçün nümunə uran və qurğuşun duzları kimi ağır metallarla rənglənir, bu da ya plastiklə hopdurulmamışdan öncə ya da kəsiklər edildikdən sonra aparıla bilər. Nazik-kəsikli elektron mikroskopiya ilə baxılan hüceyrə və toxuma nümunələri bu kitab boyu rast gəlinir (Şəkil 4-31). Bunu anlamaq çox əhəmiyyətlidir, çünki əldə olunan təsvirlər yalnız hüceyrənin nazik kəsiyini tərənnüm edir, ona görə də üç-ölçülü görünüşü əldə etmək üçün eyni nümunədən çoxsaylı *serial kəsikləri* hazırlamaq və serial ardıcıl təsvirlərdən nümunəni qurmaq lazımdır (Şəkil 4-32).



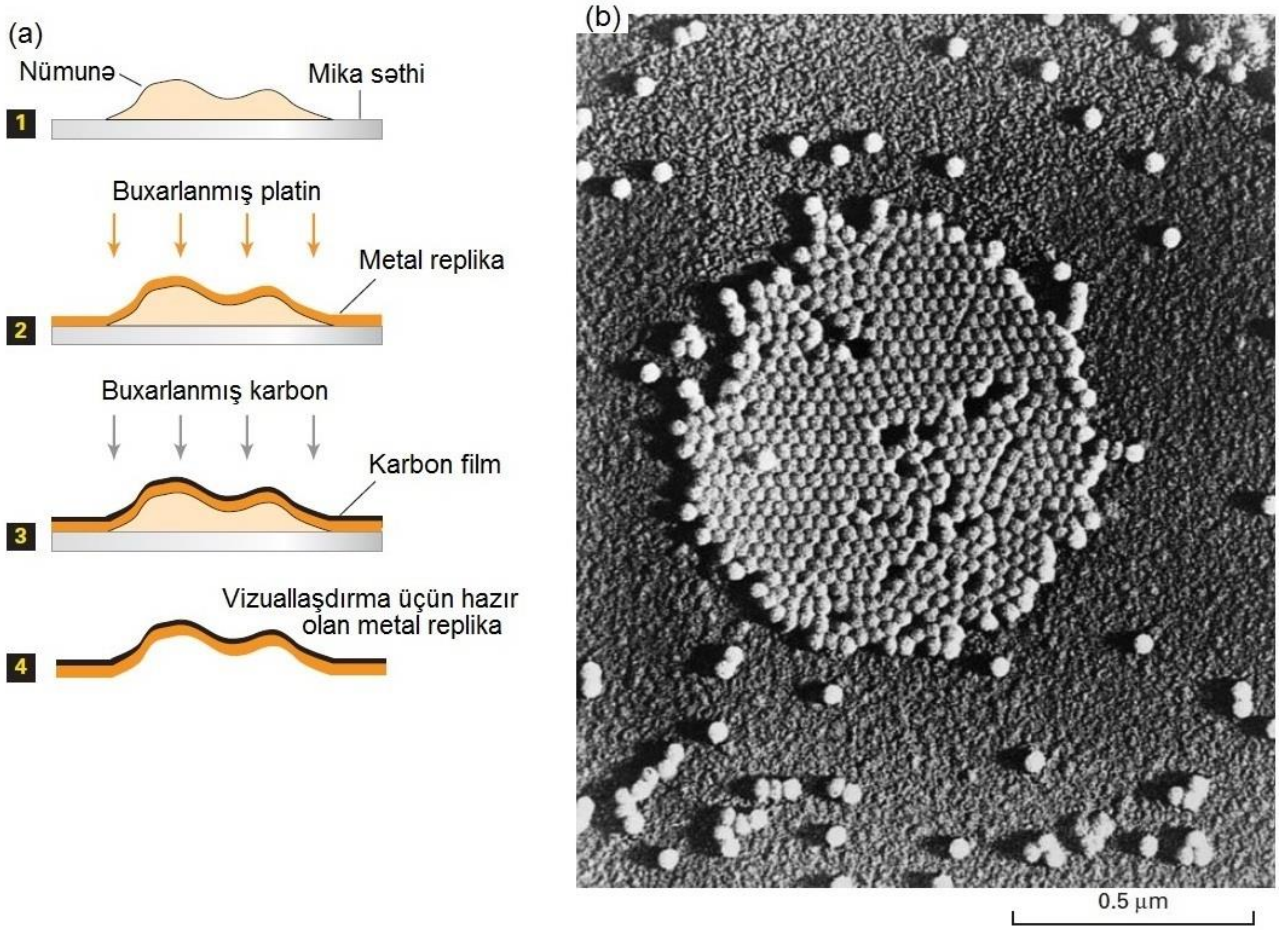
ŞƏKİL 4-28 Elektron mikroskopiyasında, təsvirlər nümunəni kəsib keçən və ya metalla-örtülmüş nümunədən səpələnən elektronlardan formalaşır. Transmissiyalı elektron mikroskopunda (TEM, *solda*) elektronlar qızdırılmış filamentlərdən ekstraksiya olunur, elektrik sahəsi ilə sürətləndirilir və maqnit kondensatorun linzası ilə nümunəyə fokus olunur. Nümunəni kəsib keçən elektronlar bu nümunənin böyüdülmüş təsvirini detektorda yaratmaq üçün maqnit obyektiv və proyektorun linzaları sırası tərəfindən fluoressent baxma ekranı, fotolent, və ya yüklənmiş-cüt-cihazlar (charged-couple-device – CCD) kamerası ola bilən detektorda fokus olunur. Skanedici elektron mikroskopunda (SEM) elektronlar kondensatorla və obyektivin linzaları ilə metalla örtülmüş nümunədə cəmlənir (fokus olunur). Skan edən sarğac nümunə boyunca şüaları hərəkət etdirir və metaldan səpilmiş elektronlar fotoegücləndirici boru detektor tərəfindən toplanır. Hər iki tip mikroskopda, elektronlar hava molekulları tərəfindən asanlıqla səpələndiyindən bütün kolonka çox yüksək vakum altında saxlanılır.

İmmunoelektron Mikroskopiya Zülalları Yerini Ultraquruluş Səviyyəsində Aşkar Edir

Məhz immunofluoressent mikroskopiyasından işıq mikroskopu səviyyəsində zülalların lokalizasiyasında istifadə edildiyi kimi anticismlərdən istifadə edərək nazik kəsiklərdə zülalların yerinin elektron mkikroskop səviyyəsində tapılması üçün də metod işlənilib hazırlanmışdır. Amma, ənənvi nazik kəsikləri hazırlamaq üçün sərt prosedurlar istifadə olunur – kimyəvi fiksasiya və plastikdə hopdurma antigenləri elə denaturasiya və ya modifikasiya edə bilir ki, onlar spesifik anticismlər tərəfindən tanına bilmirlər. Daha incə metodlar, məsələn yüngül fiksasiya, materialın maye azot temperaturunda dondurulduqdan sonra kəsiklərə ayrılması və ardınca da anticismılə otaq temperaturunda inkubasiya olunmması metodları inkişaf etdirilmişdir. Anticismləri elektron mikroskopunda görünə bilən etmək üçün o, elektron-sıx markerə yapışdırılmalıdır. Bunu etmək üçün bir yol, bütün anticism molekullarında Fc seqmentinə birləşən bakterial zülal olan A zülalı ilə örtülmüş elektron-sıx qızıl zərrəciklərinin istifadə edilməsidir (Şəkil 4-33). Qızıl zərrəciklər gələn elektronları difraksiya etdiyindən onlar qara ləkələr kimi görünürlər.



ŞƏKİL 4-29 Mənfi (neqativ) rənglənmiş nümunələrin transmissiya elektron mikroskopiyası incə cizgiləıri aşkar edir. (a) Nümunələr transmissiyalı elektron mikroskopu (TEM) üçün adətən kiçik mis və ya qızıl tora quraşdırılır. Adətən tor çox nazik plastik və karbon təbəqə ilə örtülü olur, və nümunə buna yapışa bilir. (b) Sonra nümunə, uranil asetat kimi ağır metalda inkubasiya olunur və rəngin artığı uzaqlaşdırılır. (c) Nümunədə rəng istisna edilir, ona görə də TEM ilə müşahidə olunanda o mənfi konturda (neqativdə) görünür. (c)-də olan misal rotavirusların mənfi konturlarıdır (neqatividir). [(c) hissəsi ISM/Phototake.]

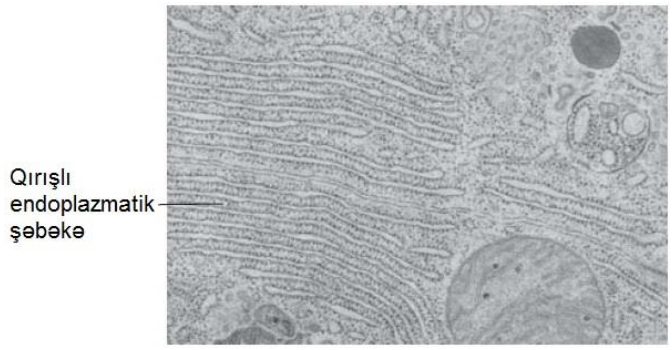


ŞƏKİL 4-30 Metal kölgələmə çox kiçik nümunələrdə səth detallarını transmissiyalı elektron mikroskopu ilə görünən edir. (a) Nümunə mika səthə yayılmışdır və sonra vakum buxarlandırıcıda qurudulmuşdur (pillə 1). Nümunə toru, metal sapları elektrik qızdırma yolu ilə buxarlandırmaqla platin və ya qızıl kimi ağır metalların nazik plyonkası ilə örtülmüşdür (pillə 2). Replikanı stabilləşdirmək üçün nümunə sonra çox qızdırılmış elektroddan buxarlandırmaqla karbon plyonka ilə örtülmüşdür (pillə 3). Sonra bioloji material turşu və ağardıcı ilə həll edilmiş (pillə 4) və qalan metal replika TEM ilə tədqiq edilmişdir. Bu cürə preparatın elektron mikrofotolarında karbonla-örtülü sahələr işıqlı görünür – nümunələrin mikrofotolarının əksi metalla rənglənmiş preparatlardır, burada ağır metalla rənglənmiş sahələr daha qaranlıq (qara) şəkildə görünür. (b) Polivirus zərrəciklərinin platinlə kölgələnmiş replikası. [(b) hissəsi Science Source]

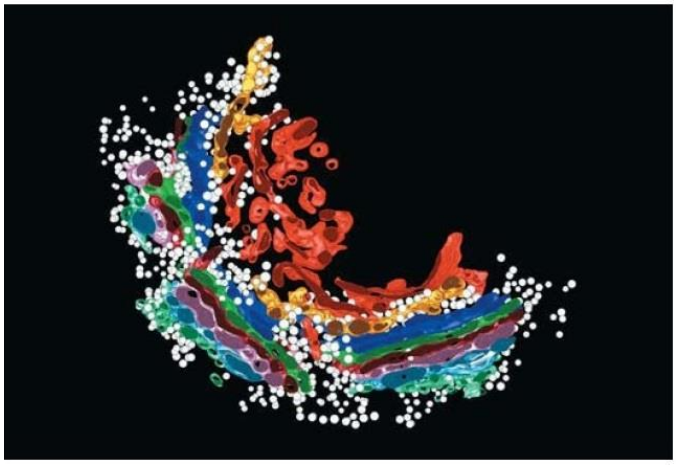
Krioelektron Mikroskopiya Nümunələri Fiksasiya Olunmadan və Rənglənmədən Vizuallaşdırmağa İmkan Verir

Standart transmisiya elektron mikroskopiyası canlı hüceyrələri öyrənmək üçün istifadə oluna bilmir və suyun olmaması onlarda makromolekulların denaturasiyasına və qeyrifunksional olmaslna səbəb olur. Amma, hidrasiya olunmuş, fiksasiya olunmamış və rənglənməmiş bioloji nümunələr, əgər dondurulmuşdursa onlara birbaşa transmissiya elektron mikroskopunda baxıla bilər. *Krioelektron mikroskopiyası* adlanan bu metodda nümunənin su suspenziyası maye azotda dondurulmuş tor üzərinə həddən artıq nazik təbəqədə keçirilir və xüsusi bərkidilmələrlə bu vəziyyətdə saxlanılır. Sonra donmuş nümunə elektron mikroskopuna yerləşdirilir. Çox aşağı temperatur (-196 ºC) suyu hətta vakumda belə buxarlanmaqdan qoruyub saxlayır. Beləliklə, nümunə təbii hidratlaşmış formsında, fiksasiya olunmadan və ağır metal ilə rənglənmədən detalları ilə müşahidə oluna bilər. Yüzlərlə təsvirin kompüterə əsaslanan ortalaması ilə təxminən atom rezolyusiyasında üç-ölçülü model yaradıla bilər. Məsələn, bu metod ribosomların modelinin, Fəsil 11-də müakirə olunan əzələ kalsium kanalının və kristallaşdırılması çətin olan digər böyük zülalların modelinin yaradılmasında istifadə edilmişdir (Şəkil 5-43b).

Bu metodun genişləndirilməsi olan *krioelektron tomoqrafiyası* tədqiqatçılara buza keçirilmış, canlı aləmə daha yaxın vəziyyətdə olan orqanoidlərin və ya hətta tam hüceyrənin üç-ölçülü quruluşunu (arxitekturasını) təyin etməyə imkan verir. Tək şəkil, dərinliyi haqqında məlumat olmayan iki-ölçülü quruluşu təmsil edir. Amma, eyni quruluşa müxtəlif bucaq altından baxmaq bizə üç-ölçülü perspektivi verir. Krioelektron tomoqrafiyasında nümunə tutqacı kiçik artımla elektron şüalarına perpendikulyar olan ox ətrafında əyilir, beləliklə, onun yektin təsviri müxtəlif istiqamətlərdən görünməklə alınır (Şəkil 4-34a, b). Sonra təsvirlər kompüter vasitəsi ilə *tomoqramma* adlanan üç-ölçülü rekonstruksiyada birləşdirilir (Şəkil 4-34c, d). Krioelektron tomoqrafiyanın çatışmayan cəhəti odur ki, nümunələr müqayisəli dərəcədə nazik olmalıdır, təxminən 200 nm, bu konfokal işıq mikroskopiya ilə tədqiq oluna bilən nümunələrdən (200 µm qalınlıqda) daha çox nazikdir.



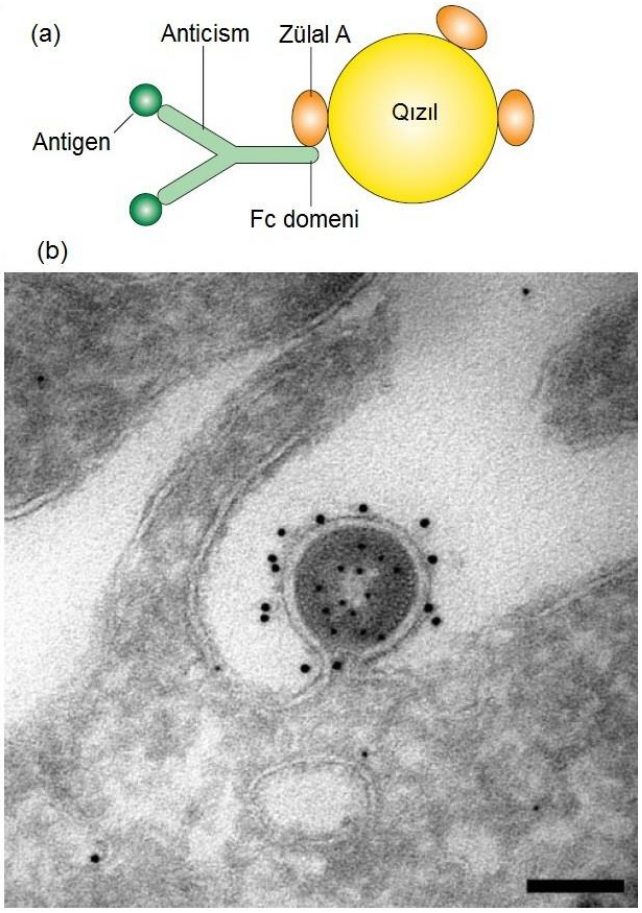
ŞƏKİL 4-31 Transmissiyalı elektron mikroskopiya ilə görüntülənən nazik kəsiyin nümunəsi. Mədəaltı vəz hüceyrələrinin kəsikləri zülalların sintezində və həzm fermentlərinin ifrazında iştirak edən geniş qırışlı endoplazmatik şəbəkəni göstərir. [Keith R. Porter Archive, Mariland Universitetiç Baltimor.]



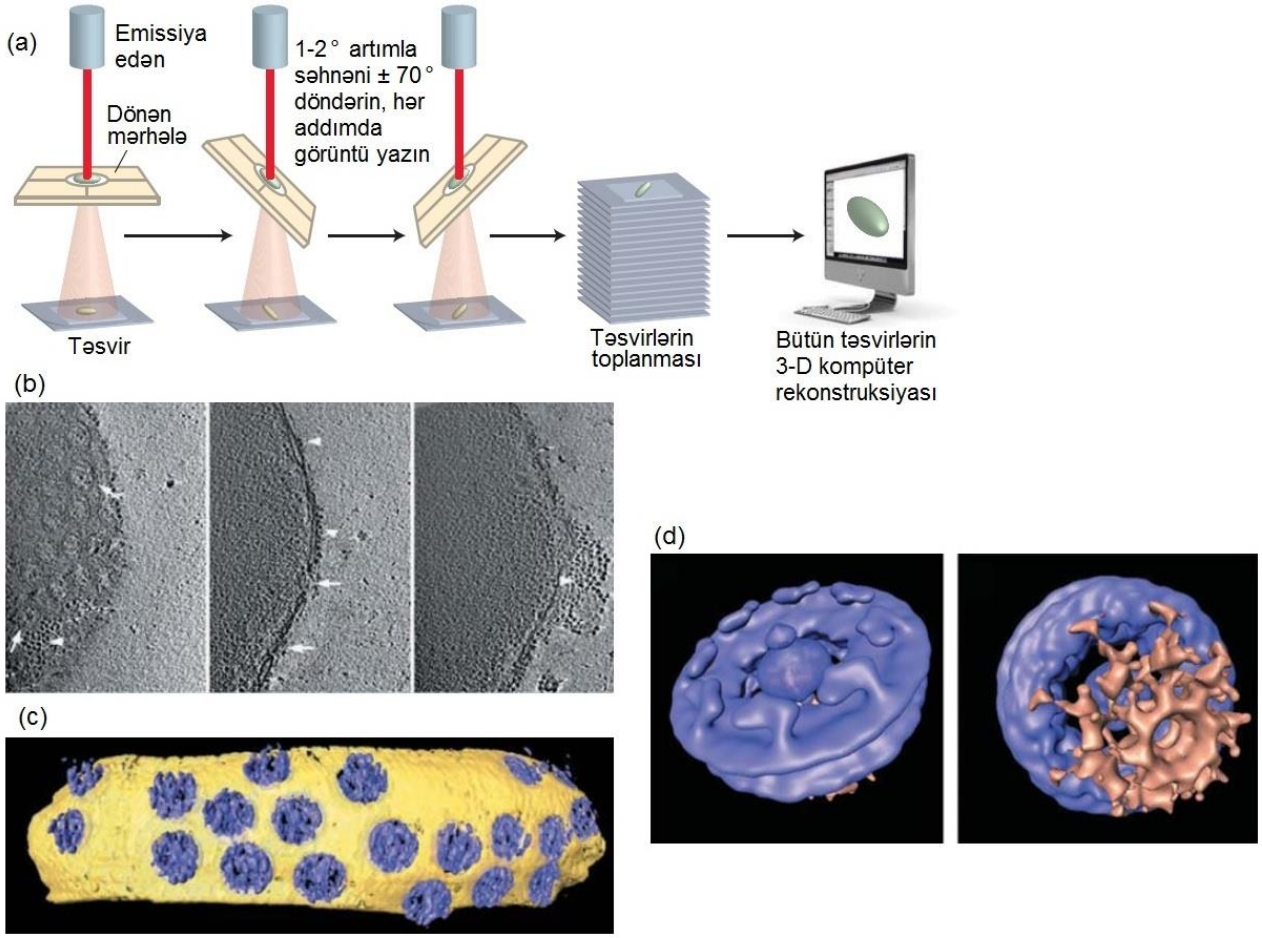
ŞƏKİL 4-32 Qolci kompleksinin elektron mikroskopu təsvirlərinin üç-ölçülü rekonstruksiyasına əsaslanan modeli. Qırışlı ER-dan tumurcuqlayaraq ayrılan nəqliyyat qovcuqları (ağ kürələr) Qolci kompleksinin *cis* membranı ilə qovuşur (açıq mavi). Fəsil 14-də təsvir olunan mexanizmlə, zülallar *cis* rayondan *medial* (*orta*) rayona və nəhayət sonda Qolci kompleksinin *trans* rayonuna keçirlər. Tədricən sonda, qovcuqlar *trans*-Qolci membrandan tumurcuqlayaraq ayrılır (narıncı və qırmızı), bəziləri hüceyrə səthinə gedir digərləri isə lizosomlara gedirlər. Qırışlı entoplazmatik şəbəkə kimi Qolci kimpleksi də ifrazat hüceyrələrində çox məşhurdur. [B.J. Marsh &K.E. Howell, 2002, *Nature Rev.Mol.Cell Biol.* **3**, 789-785.]

Metalla Örtülmüş Nümunənin Skanedici Elektron Mikroskopiyası Səth Xüsusiyyətlərini Aşkar Etdi

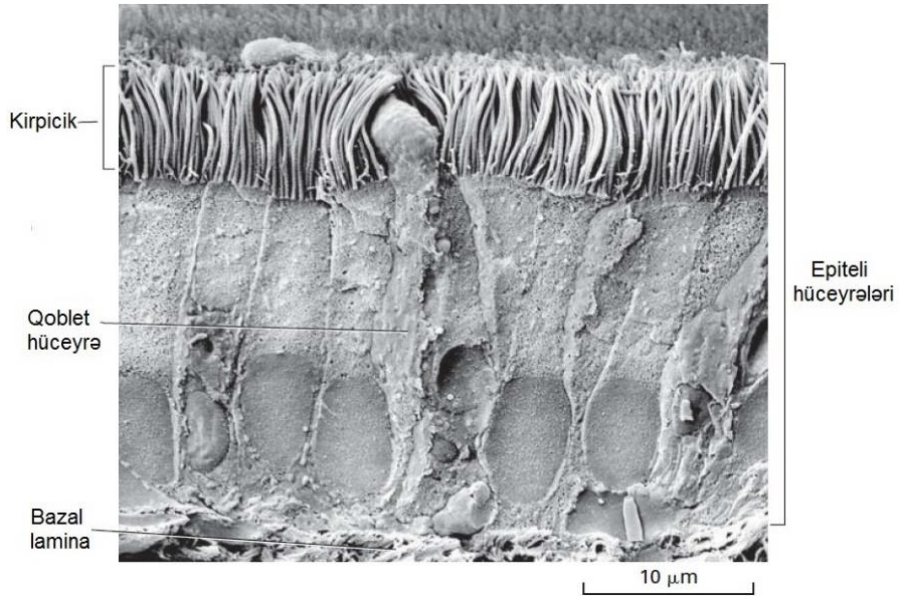
Skanedici elektron mikroskopiya (SEM) tədqiqatçıların kəsiklərə-ayrılmamış metalla-örtülü nümunələri müşahidə etməsinə imkan verir. Mikroskopun daxilində gərgin elektron şüaları nümunəni sürətlə skan edir. Örtükdə olan molekullar həyacanlanır və ssintilyator detektora fokuslanan ikinci elektronları buraxır, nəticədə yaranan siqnal, daha çox adi televizordakılara bənzər olan, katod-şüa borucuqda ekranlaşdırılır (bax Şəkil 4-28, *sağda*). Nəticədə alınan skaner elektron mikrofotosi üç-ölçülü görünüşə malik olur, çünki nümunənin istənilən hər hansı bir nöqtəsi tərəfindən buraxılan ikinci elektronların sayı elektron şüaların səthə olan bucağından asılıdır (Şəkil 4-35). Metal örtüyün qalınlığı ilə məhdudlaşan skanedici elektron mikroskopun həlledici gücü, təxminən 10 nm-dir, bu transmissiyalı cihazlardakındn çox aşağıdır.



ŞƏKİL 4-33 Zülal A ilə örtülmüş qızıl zərrəciklər transmissiya elektron mikroskopiyası ilə anticism-birləşmiş zülalı aşkar etmək üçün istifadə olunur. (a) Birinci, fiksasiya olunmuş toxuma kəsiyində anticismlərə öz spesifik antigeni ilə əlaqə yaratmağa imkan verilir. Sonra kəsiyə, *S. aureus* bakteriyasının A zülalı ilə örtülmüş elektron-six qızıl hissəcikləri ilə təsir edilir. Birləşmiş A zülalın anticism molekullarının Fc domenlərinə birləşməsi hədəf zülalın elektron mikroskopunda görünə bilən yerləşməsini aşkar edir. (b) Yoluxmuş Hella hüceyrələrindən tumurcuqlayan HIV zərrəcikləri. Nümunənin kriokəsiyi hazırlanmış və daxili kapsid zülalının yerini tapmaq üçün əvvəlcə kapsid zülalına olan anticismlə inkubasiya olunmuş, sonra da zülal-A-ilə örtülmüş 5-nm qızıl zərrəciklərlə inkubasiya olunmuşdur. A zülalının birləşməmiş saytları fəalsızlaşdırılmış və nümunə membrana-birləşən Env zülalının anticismi ilə, ardınca da zülal A-örtüklü 10 nm qızıl zərrəciklərlə inkubasiya olunmuşdur. 5-nm qızılla nişanlanmış kapsid zülalın və 10-nm qızılla nişanlanmış Env zülalın fərqli lokalizasiyasını görmək olur. [Nəzakətlə Annegret Pelchen-Matthews and Mark Marsh, MRC-Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London, UK.]



ŞƏKİL 4-34 Nüvə məsamələri kompleksinin (NPC) krioelektron tomoqrafiya ilə çəkilmiş quruluşu. (a) Elektron tomoqrafiyasında, iki-ölçülü proyeksiya təsvirlərinin yarımdairəvi seriyası mərkəzdə yerləşmiş üç-ölçülü nümunədən yazılmışdır; elektron optika və detektor hərəkətsiz dayandığı halda nümunə əyilir (kənara çıxır). Üç-ölçülü quruluş, sonra müxtəlif istiqamətlərdən gələn toplanmış iki-ölçülü təsvirlərdən kompüterlə hesablanmışdır. (b) *Dictyostelium discoideum* kif hüceyrələrindən alınan nüvə nümunələri dərhal maye azotda dondurulmuş və elektron mikroskopunda müşahidə olunana qədər bu vəziyyətdə saxlanılmışdır. Panel üç ardıcıl əyilmiş təsvirləri göstərir. NPC-lərin müxtəlif orientasiyaları (oxlar) yuxarıdakı görüntüdə (*solda və sağda*) və yan görüntüdə (*sağda*) göstərilir. Xarici nüvə membranı ilə əlaqəli olan ribosomlar, qırışlı ER ləkələri kimi görünürlər (ox başları). (c) Nüvə qabığı membranı seqmentinin (sarı) kompüterlə-yaradılan səthi-göstərən təsviri (sarı) NPC-lərlə (mavi) örtülmüşdür. (d) Çoxsaylı nüvə məsamələri təsvirlərinin ortalaması ilə daha çox detallar fərqləndirilə bilər. Bax S.Nickel et al., 2006, *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**:225. [(b), (c) və (d) hissələri M. Beck et al., 2004, *Science* **306**:1387-dən.]



ŞƏKİL 4-35 Skanedici elektron mikroskopiya (SEM) kəsiklərə ayrılmayan nümunənin səthinin üç-ölçülü təsvirlərini yaradır. Burada göstərilən, traxeya hüceyrələrinin SEM təsviridir. Ortadakı selik ifraz edən qoblet hüceyrələrdir. Qobelt hüceyrələrin hər iki tərəfindəkilər apikal səthləri kirpiciklərlə zəngin olan epitel hüceyrələrdirlər. [Steve Gschmeissner/Science Source.]

4.3 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Elekjton Mikroskopiyası: Yüksək-Rezolyusiyalı Təsvirlərin Alınması

- Elektron mikroskopiyası, nümunələrin təsvirinin alnmasında yüksək enerjili elektronların qısa dalğa uzunluqlarını istifadə etdiyindən çox yüksək-rezolyusiyalı təsvirləri yaradır.
- Zülallar və viruslar kimi sadə nümunələr transmissiyalı elektron mikroskopiyasında (TEM) tədqiq etmək üçün ağır metallarla mənfi (neqativ) rənglənə və ya kölgələnə bilər.
- Daha qalın nümunələr, TEM ilə baxmazdan öncə fiksasiya olunmalı, dehidrasiya olunmalı, plastikə hopturulmalı, kəsiklərə ayrılmalı və sonra da, elektron-sıx ağır metallarla rənglənməlidirlər.
- Spesifik zülallar, ağır metal markerlərlə, məsələn, kiçik qızıl zərrəciklərə assosasiya olunmuş spesifik anticismləri tətbiq etməklə TEM vasitəsi ilə lokalizasiya oluna bilər.
- Krioelektron mikroskopiya, hidratlaşmış, fiksasiya olunmamış və rənglənməmiş bioloji materialların, çox aşağı temperaturda saxlamaqla TEM vasitəsi ilə tədqiq olunmasına imkan verir.
- Metalla-kölgələnən materialların skanedici elektron mikroskopiyası (SEM) nümunənin səth xüsusiyyətlərini aşkar etməyə imkan verir.

4.4 Hüceyrə Orqanoidlərinin Ayrılması və Xarakteristikası

Hüceyrələrin işıq və elektron mikroskopiyası ilə tədqiqi, eukariot hüceyrələr Fəsil 1-də təqdim edilmiş ümumi orqanoidlər dəstinə malik olması (bax Şəkil 1-12a) biliklərinin yaranmasına səbə oldu. Amma, orqanoidlərin müşahidə edilməsi və onların dəqiq quruluşunun mikroskopiya ilə sənədləşdirilməsi onların oynadığı rolu və necə fəaliyyət göstərmələrini açıq şəkildə tam aşkar etmir. Bunu öyrənmək üçün orqanoidi təbii vəziyyətində təmiz ayırmaq lazımdır və onları identifikasiya etmək, hər bir komponentin funksiyasını tutmaq lazımdır. Bu məqsədlə mikroskopiyanın üstünlükləri ilə parallel orqanoidlərin ayrılması və xarakterizə olunması metodları da yaradılıb inkişaf etdirilmişdir. Məsəlkən, lizosomlar Fəsil 1-də təsvir edildiyi kimi, bioloji materialların parçalandığı orqanoidlərdir. Lizosomlar mikroskop ilə görüntülənmişdir, amma onların funksiyası sonralar, yalnız onların ayrılması metodu yaradıldıqdan sonra aşkar edilmişdir. Orqanoid tipini təmizləmək üçün metod yaradılıb inkişaf etdiriləndə onun bütün komponentlərinin kataloqunu yaratmaq və hər bir komponentin funksiyasını araşdırmaq mümkündür. Başqa bir nümunədə, elektron mikroskopiyası aşkar etdi ki, bəzi ribosomlar endoplazmatik şəbəkə ilə assosasiyada olurlar, bu göstərir ki, ER zülalların sintez olunduğu mərkəzdir. Biz indi bilirik ki, hüceyrədən kənara ifraz olunmalı zülallar bu ribosomlarla istehsal olunur və bilirik ki, yeni sitehsal olunan ifrazat zülalı ER membranından endoplazmatik şəbəkənin lümeninə translokasiya olunur. Fəsil 13-də təsvir etdiyimiz kimi, bunun baş verdiyi mexanizmin başa düşülməsi endoplazmatik şəbəkənin ayrılmasından və ifrazat zülallarının sintezi və translokasiyası üçün in vitro sınaqların inkişaf etdirilməsindən asılıdır. Beləliklə, orqanoidləri tam başa düşməzdən öncə hər bir komponentin funksiyasını yoxlamaq üçün, son məqsəd kimi təmizlənmiş komponenmtlərdən funksional orqanoidi yaratmaqla biokimyəvi sınaqlar təşkil edilməlidir.

Orqanoidlərin əksəriyyəti lipid ikiqatlısı (membran) ilə əhatə olunur və spesifik fəaliyyəti həyata keçirirlər. Hər bir tip orqanoid özünəməxsus tanınabilən quruluşa malikdir və fəaliyyətini həyata keçirmək üçün spesifik zülallar dəstina malikdir. Hüceyrə bioloqları bu faktlardan istifadə edərək spesifik orqanoidləri identifikasiya edirlər. Məsələn, Fəsil 12-də müzakirə olunduğu kimi, hüceyrədə olan ATP-lərin çoxu ATP-sintaza vasitəsi ilə ADP-ni ATP-yə çevirməklə istehsal olunur və əsasən mitoxondridə yerləşirlər, ona görə də ATP-sintaza mitoxondrilər üçün yaxşı markerdir. Bizim aşağıda müzakirə edəcəyimiz kimi, orqanoidlər üçün spesifik markerlərin əldə oluna bilmə mümkünlüyü orqanoidlərin təmizlənməsi prosesinə kömək etdi.

Bu bölmədə biz, orqanoidləri təmizləmək məqsədi ilə hüceyrəni açmaq üçün istifadə olunan metodları müzakirə edirik. Biz blməni, orqanoidlərin tam zülal tərkibinin təyin edilməsində proteomiksin son zamanlardakı nəaliyyətləri və üstünlükləri ilə qurtarırıq.

Hüceyrənin Dağıdılması Orqanoidləri və Başqa Tərkib Hissələrini Azad Edirr

Subhüceyrə quruluşların təmizlənməsinin ilkin mərhələsi plazma membranı və əgər varsa hüceyrə divarını dağıtmaqla hüceyrənin tərkib hissəsinin azad edilməsidir. Birincisi, hüceyrələr müvafiq pH-da və duz tərkibində saxlanılır, bu adətən izotonik saxaroza məlulunda (0.25 M) və ya hüceyrə daxilinin tərkibinə uyğun olan duzların kombinasiyasında olur. Çox hüceyrələr onları suspenziyada blender vasitəsi ilə sürətlə qarşdırdıqda və ya yüksək tezlikli ultrasəslə təsir etdikdə (*sonifikasiya*) qırılır. Alternativ olaraq plazma membranı xüsusi təzyiq altında olan toxuma homogenizatoru ilə qırıla bilər, bu zaman, burada hüceyrələr porşen ilə borucuq divarı arasında çox dar yerdən təzyiq altında keçməyə məcbur edilir, porşenlə borucuq divarı arasındakı təzyig hüceyrənin dağılmasına səbəb olur.

Xatırladaq ki, hipotonik məhlula keçiriləndə su hüceyrə daxilinə axır, çünki burada hüceyrə daxilinə nisbətən aşağı ion qatılığı və kiçik molekullar vardır. Belə osmotik axın hüceyrələrin şişməsində, plazma membranın zəiflənməsində və membranın dağılmasının asanlıaşdırılmasında istifadə oluna bilər. Ümumiyyətlə, hüceyrə tərkibi onun stabilləşdirici təsirindən buraxıldıqdan sonra, fermentlərin və başqa tərkib hissələrinin yaxşı qorunması üçün hüceyrə məhlulları 0ºC-də saxlanılır.

Hüceyrənin dağıdılması hüceyrə komponentlərinin qatışığını, *homogenatı* yaradır, bundan isə nəzərdə tutulan (istənilən) orqanoidi çıxarıb ayırıla bilər. Siçovulun qara ciyəri bir tip hüceyrə ilə zəngin olduğundan, bu toxuma hüceyrənin bütün tip orqanoidlərinin çoxsaylı klassik tədqiqatlarında istifadə olunmuşdur. Amma, eyni ayrılma prinsipləri virtual olaraq bütün tip toxumalara və hüceyrələrə tətbiq oluna bilər və hüceyrə-fraksiyalaşdırması metodunun bu modifikasiyası istənilən arzuolunan komponentin ayrılmasında istifadə oluna bilər.

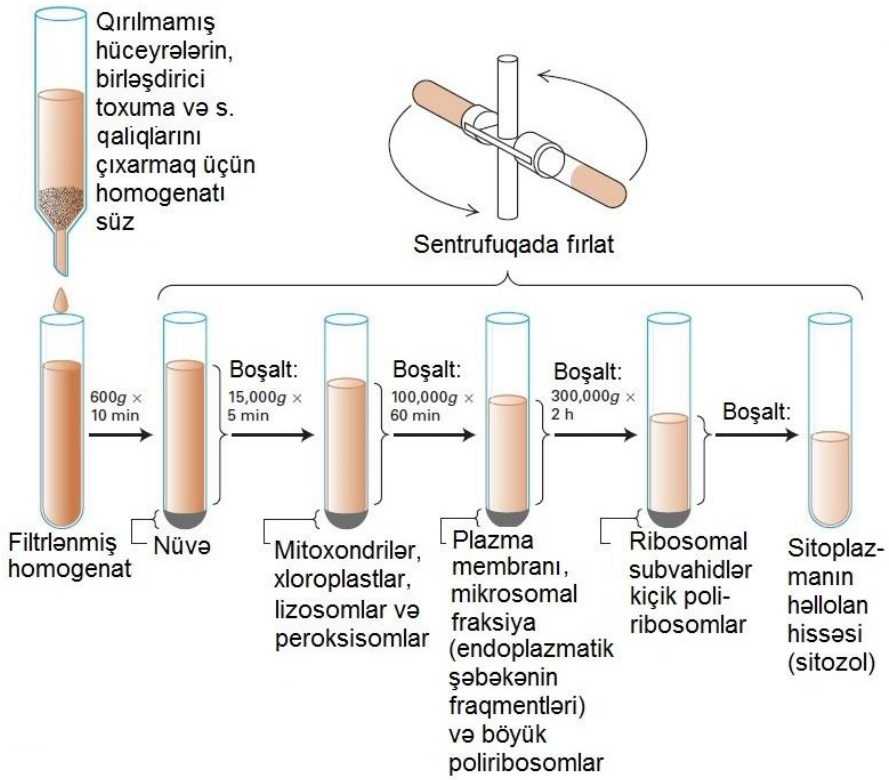
Sentrifuqalama Çoxsaylı Müxtəlif Tipli Orqanoidləri Ayıra Bilir

Biz Fəsil 3-də sentrifuqalaşdırmanın prinsiplərini, zülalların və nuklein turşularının ayrılmasında sentrifuqalaşdırma metodunun istifadə olunmasını öyrəndik. Oxşar yanaşmalardan həm ölçüsünə həm də sıxlığına görə fərqli olan və ona görə də müxtəlif sürətlərdə sedmentasiyaya uğrayan müxtəlif orqanoidlərin ayrılıb təmizlənməsində də istifadə olunur.

Hüceyrə-fraksiyalaşdıran prosedurların əksəriyyəti filtrdən süzülmüş hüceyrə homogenatlarının artan yüksək sürətlə *differensial sentrifuqalaşdırması* ilə başlayır (Şəkil 4-36). Müəyyən zaman müddətində hər bir sürətlə sentrifuqalaşdırmadan sonra sentrifuqa tyubunun yuxarısında qalan *supernatant* adlanan maye hissə başqa tyuba keçirilib yenidən daha yüksək sürətlə fırladılır. Differensial sebtifuqalaşdırma nəticəsində alınan çöküntülər əsasən müxtəluf orqanoidlərin qatışığını təşkil edir, hərçənd ki, nüvə və virus zərrəcikləri bəzən bu prosedurla tam təmizlənə bilir.

Differensial sentrifuqalama yolu ilə alınan tamm təmizlənməmiş orqanoid fraksiyası sonra *tarazlıq sıxlıq-qradienti sentrifuqalama* yolu ilə daha da təmizlənə bilər, bu zaman hüceyrə komponentləri sıxlıqlarına görə ayrılırlar. Fraksiyalar suspenziya halına gətirildikdən sonra onlar tyubda qeyri-ion maddələrdən (məsələn saxaroza və ya qliserin) hazırlanmış sıxlıq qradienti məlulunun yuxarısına yerləşdirilir. Tyub yüksək sürətlə (təxminən 40000 rpm) bir neçə saat müddətində fırladılır, tyubda hər bir zərrəcik (orqanoid) mühüt sıxlığının onun öz daxili sıxlığına bərabər olan hissəsinə qədər miqrasiya etməsinə imkan verilir (Şəkil 4-37). Mayenin differensial təbəqələri sonra çox nazik borucuqla sorulma yolu ilə sentrifuqa tyubundan ayrılır və fraksiyalar toplanır.

Hər bir orqanoid unukal morfoloji xüsusiyyətə malik olduğundan, orqanoid preparatının təmizliyi elektron mikroskopunda yoxlanıla bilər. Alternativ olaraq orqanoid-spesifik marker molekullar miqdari analiz oluna bilər. Məsələn, sitoxrom ***c*** zülalı yalnız mitoxondridə mövcud olur, ona görə də bu zülalın lizosom fraksiyasında mövcud olması onun mitoxondri ilə çirklənməsini göstərir. Buna oxşar olaraq, katalaza yalnız peroksisomlarda olur; turş fosfataza yalnız lizosomlarda olur; ribosomlar isə qırışlı endoplazmatik şəbəkələrdə və ya sitozolda olurlar.



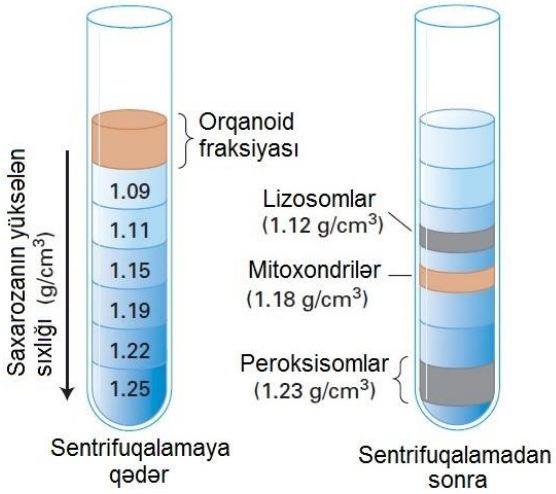
ŞƏKİL 4-36 Differensial sentrifuqalama hüceyrə homogenatının fraksiyalara ayrılmasında çox istifadə olunan ilkin mərhələdir. Hüceyrələrin dağıdılmasından əmələ gələn homogenat adətən dağılmamış hüceyrələri uzaqlaşdırmaq üçün filtrdən süzülür və sonra da ən böyük orqanoid olan nüvəni selektiv çökdürmək üçün aşağı sürətlə fırladılır. Çökməyən material (supernatant) növbəti dəfə, mitoxondrinləri xloroplastları lizosomları və peroksisomları çökdürmək üçün daha yüksək sürətlə sentrifuqalanır. Ultrasentrifuqada 100000g sürətlə 60 dəqiqə muddətundə sonrakı sentrifuqalama plazma membranının, endoplazmatik şəbəkənin fraqmentlərinin və böyük poliribosomların çökməsi ilə nəticələnir. Ribosomal subvahidlərin bərpası, kiçik poliribosomlar və ferment kompleksləri kimi zərrəciklər əlavə, daha da yüksək sürətlə sentrifuqalamanı tələb edir. 300000g sürətlə 2 saat fırlatdıqdan sonra yalnız sitozol – sitoplazmanın həll olan su maye hissəsi supernatantda qalır.

Orqanoid-Spesifik Anticismlər Yüksək Təmizlənmiş Orqanoidlərin Hazırlanmasında Faydalıdırlar

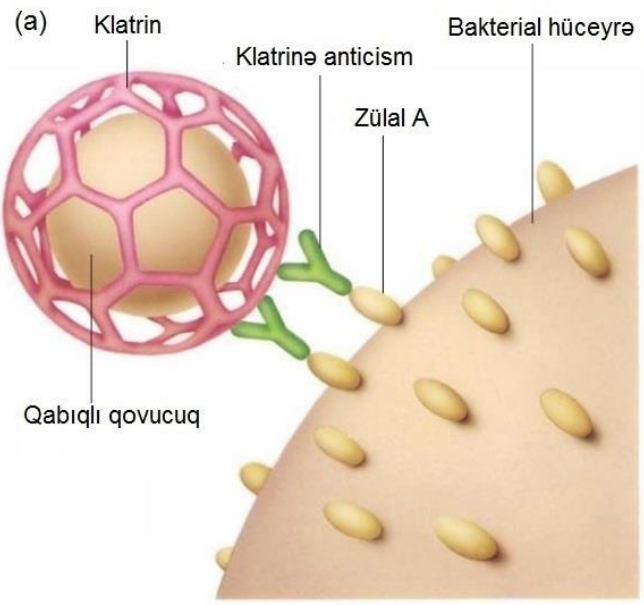
Differensial və tarazlıq sıxlıq-qradienti sentrifuqalamalardan sonra qalan hüceyrə fraksiyaları adətən birdən artıq orqanoid tipinə malik olurlar. Müxtəlif orqanoid-spesifik membran zülallarına spesifik olan monoklonal anticismlər belə fraksiyaların sonrakı təmizlənməsi üçün çox güclü vasitədir. Xarici səthi klatrin zülalı ilə örtülü olan qovcuqların təmizlənməsi bunlara bir misaldır, örtülü olan bu qovcuqlar reseptorla-vasitələnən endositoz zamanı plazma membranında qabıqlı batıqlardan yaranır, bu mövzu Fəsil 14-də müzakirə olunacaq. Öz səthində A zülalını ekspressiya edən bakteriyanın ölü hüceyrələrinə birləşən klatrinə olan anticism membranların xam preparatında slektiv şəkildə bu qovucuqlara birləşir və sonra bütün anticism kompleksi aşağı sürətli sentrifuqalama yolu ilə təmizlənə bilir (Şəkil 4-38). Buna oxşar metodda, spesifik anticismlərlə örtülü olan çox kiçik metal zərrəciklərdən

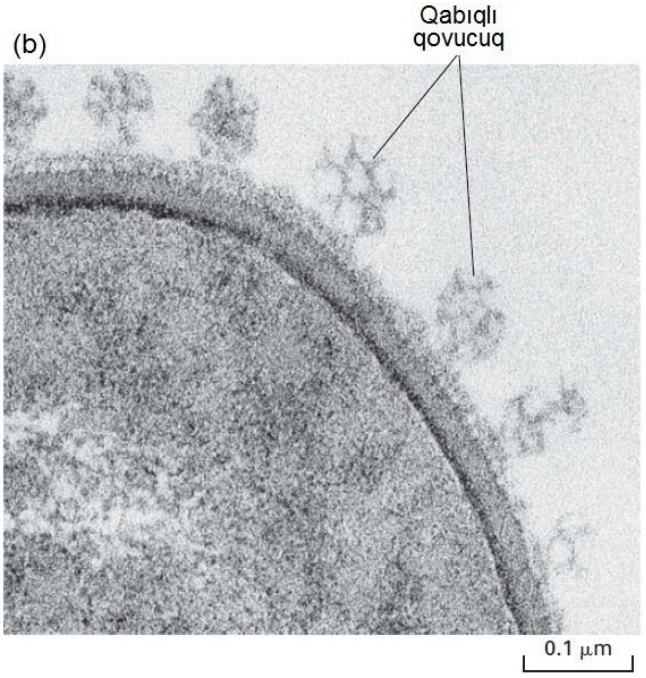
istifadə edilir. Anticismlərə birləşən və beləliklə də metal zərrəciklərlə bağlanan orqanoidlər preparatdan kiçik sınaq şüşəsinin kənarlarında olan maqnitə yapışmaqla ayrıla bilir.

Bütün hüceyrələr bir düyün (12 ədəd) və daha artıq, təxminən eyni ölçüdə (50-dən 100 nm qədər diametrdə) və eyni sıxlıqda olan müxtəlif tipli kiçik membranla-məhdudlaşan qovcuqlara malikdirlər, ona görə sentrifuqalama metodu ilə onları bir-birindən ayırmaq çətin olur. Xüsusi sinifə aid olan belə qovucuqları təmizləmək üçün immunoloji metodlar xüsusən əhəmiyyətlidirlər. Yağ və əzələ hüceyrələri, məsələn, bu cürə qovucuqların birinin membranında yerləşmiş xüsusi qlükoza transporterinə (GLUT4) malikdirlər. İnusulin hüceyrələrə əlavə ediləndə bu qovucuqlar plazma membranı ilə qovuşur və qandan qlükozanı götürməyə qabil olan qlükoza transporterlərinin sayını artırır. Bizim Fəsil 15-də görəcəyimiz kimi, bu proses qanda şəkərin müvafiq olan qatılığını saxlamaq üçün çox kritikdir (vacibdir). GLUT4-ə malik olan qovucuqlar GLUT4 zülalının sitozol tərəfə baxan seqmentinə birləşə bilən anticismlərdən istifadə etməklə təmizlənə bilər. Eyni ilə, Fəsil 14-də müzakirə olunan müxtəlif transport qovucuqları unikal səth zülalı ilə xarakterizə olunurlar, bu da onların spesifik anticismlərin köməyi ilə təmizlənməsinə imkan verir.



ŞƏKIL 4-37 Qatışıq orqanoid fraksiyası tarazlıq sıxlıq-qradienti sentrifuqalama ilə daha da təmizlənə bilər. Siçovulun qaraciyərini istifadə edən bu nümunədə, 15000g sentrifuqalamanın çöküntüsündə olan material (bax Şəkil 4-36) yenidən suspenziya olundu və sentrifuqa tyubunda artan sıxlıq üzrə saxaroza qradientinin uzərinə yerləşdirildi. Bir neçə saat müddətində sentrifuqalama zamanı hər bir orqanoid öz bərabər sıxlıq qradientinə miqrasiya etdi və orada qaldı. Lizosomların mitoxondrilərdən yaxşı ayrılmasına nail olmaq üçün toxuma dağıdılmamışdan öncə ona tərkibində az miqdarda detergent olan məhlul çiləndi. Bu çiləmə zamanı detergent endositoz yolu ilə hüceyrəyə daxil olur və lizosomlara ötürülür, bu da onları onların normal halda olduqlarından daha az sıxlığa malik edir və nəticədə bu lizosomların mitoxondrilərdən təmiz ayrılmasına imkan verir.





ŞƏKİL 4-38 Örtüklü qovucuqlar qovucuğun səth zülalına-spesifik olan və bakterial hüceyrələrə bağlanan anticismin birləşməsi ilə təmizlənə bilər. Bu misalda, siçovulun qara ciyərindən alınan membran suspenziyası, müəyyən sitozol qovucuqlarının xarici səthini örtən zülal klatrinə-spesifik anticismlə inkubasiya olunur. Bu qatışığa, ölmüş *Staphylococcus aureus* bakteriyasının suspenziyası əlavə olunur, bu bakteriyanın səth membranı anticismlərin sabit (Fc) rayonuna birləşən A zülalına malikdir. (a) A zülalının klaritin-örtüklü qovucuqlara birləşmiş anticismlə qarşılıqlı əlaqəsi qovucuqları bakterial hüceyrələrlə əlaqələndirir. Qovucuq-bakteria komplekslər aşağı sürətli sentrifuqalama ilə ayrıla bilər. (b) Nazik-kəsiyin elektron mikrofotosu *S.aureus* hüceyrəsi birləşmiş klatrin-örtüklü qovucuqları aşkar edir. Bax E. Merisko et al., 1982, *J.Cell Biol*. **93**:846. [Mikrofoto nəzakətlə George Palade-dən.]

Bu metodun bir variantı, tədqiq olunan orqanoidə spesifik anticism mümkün olanda istifadə edilir. Orqanoid-spesifik membran zülalını kodlaşdıran gen ona epitop yarlığı kodlaşdıran seqmenti əlavə etməklə modifikasiya olunur, yarlık zülalın sitozola baxan seqmentinə yerləşdirilir. Tədqiq olunan hüceyrədə rekombinant zülalı stabil ekspressiya etməklə, anti-epitop monoklonal anticism (yuxarıda təsvir olunan) orqanoidin təmizlənməsində istifadə edilə bilər.

Proteomiks Orqanoidlərin Zülal Tərkibini Aşkar Edir

Biz bu bölməni orqanoidlərin komponentlərini identifikasiya etmək üçün onları ayırmağın necə vacib olduğunu vurğulayaraq təqdim etdik. Hər bir orqanoiddə tam zülal tərkibinin inventarizasiyası üçün uzun illər texnologiya kifayət qədər inkişaf etməmişdir, amma son zamanlar genomiksin və mass spektrometriyanın nailiyyətləri bunu mümkün etdi. Bu yanaşma Fəsil 3-də müzakirə olunduğu kimi, orqanoid ayrılmasını proteomkis metodları ilə birləşdirdi.

Orqanoiddə olan bütün zülalların identifikasiya olunması üç mərhələni tələb edir. Birincisi, tədqiqatçı orqanoidi yüksək təmizlikdə ala bilməlidir. İkincisi, o orqanoiddə olan bütün zülalların ardıcıllıqlarını identifikasiya etmək yolunu tapmalıdır. Bu identifikasiya əsasən bütün zülalların proteazalarla, məsələn bütün polipeptidləri lizin və arginin qalıqlarından kəsən tripsinlə parçalanması ilə həyata keçiriilir və sonra, alınan bu peptidlərin kütləsi və ardıcıllıqları mass spektrometriya yolu ilə təyin edilir. Üçüncüsü, o, bütün bu peptidlərin alındığı zülalları identifikasiya etmək üçün genom ardıcıllığına malik olmalıdır. Bu istiqamətdə, çox orqanoidlərin "proteomaları" təyin edilmişdir. Bir nümunə kimi, son zamanlarda siçanın beynindən, ürəyindən, böyrəyindən və qaraciyərindən təmizlənmiş mitoxondri üzərində aparılmış proteome tədqiqatları 591 mitoxondrial zülalları aşkar etdi, onlardan bu orqanoidlə birləşmiş 163 zülal əvvəllər məlum olmamışdır. Bir sıra zülallar mitoxondrilərdə yalnız bəzi spesifik hüceyrə tiplərində tapılmışdır. Bu yeni identifikasiya olunmuş mitoxondri zülallarının fəaliyyətinin təyin edilməsi bu orqanoid üzrə aparılan müasir tədqiqatların əsas məqsədidir.

4.4 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Hüceyrə Orqanoidlərinin Ayrılması

- Mikroskopiya, eukariot hüceyrələrdə mövcud olan orqanoidlərin ümumi dəstinin aşkar etdi.
- Hüceyrələrin güclü homogenizasiya, sonikasiya və ya digər metodlarla dağıdılması onların orqanoidlərini azad edir. Hüceyrələrin hipotonik məhlullarda şişməsi plazma membranını zəiflədir, onun dağılmasını asanlaşdırır.
- Hüceyrə homogenatının ardıcıl differensial sentrifuqalanması, sıxlığına və kütləsinə görə fərqli olan qismən təmizlənmiş orqanoidlərin fraksiyalarını verir.
- Hüceyrə komponentlərini onların sıxlığına görə ayıran tarazlıq sıxlıq-qradienti sentrifuqalama differensial sentrifuqalamadan alınan hüceyrə fraksiyalarını sonra daha da təmizləyə bilir.
- İmmunoloji metodlar anticismlərdən orqanoid-spesifik membran zülallarına qarşı istifadə etməklə orqanoidlərin təmizlənməsində xüsusən səmərəlidir.
- Proteomiks analizləri təmizlənmiş orqanoid preparatlarında bütün zülal komponentlərini identifikasiya edə bilir.

Açar Sözlər

defferensial-interferensiya-kontrast (DIC) mikroskopiyası
dekonvolyusiya mikroskopiyası
differensial sentrifuqalama
endoplazmatik şəbəkə
endosom
faza kontrast mikroskopiyası
fluoressensiya-ilə-fəallaşan hüceyrə çeşidləyicisi (FACS)
fluoressent rəngləmə
Forster rezonans enerji ötürücüsü (FRET)
fotoağartmadan sonra fluoressensiya bərpası (FRAP)
foto-fəallaşan lokalizasiya mikroskopiyası (PALM)
hibridoma
hüceyrə xətti
hüceyrə ştammı
ximer zülallar
xloroplast
immunofluoressensiya mikroskopiyası
klon
konfokal mikroskopiya
krioelektron mikroskopiya
kultura etmək
dolayı immunofluoressensiya mikroskopiyası
Qolci kompleksi
lizosom
membran transport zülalları
metal kölgələmə
mitoxondri
monoklonal anticismlər
orqanoidlər
Parlaq-sahə işıq mikroskopiyası
peroksisom
poliklonal anticism
rezolyusiya
sitoplazma
skanedici elektron mikroskopiyası (SEM)
tarazlıq sıxlıq-qradient sentrifuqalama
transmissiya elektron mikroskopiyası (TEM)
ümumi daxili refletsiya fluoressensiya (TIRF) mikroskopiyası

Konsepsiyalara Baxış

1. Həm işıq həm də elektron mikroskopiyası hüceyrələri, hüceyrə quruluşlarını və spesifik molekulların yerləşməsini vizuallaşdırmaq üçün çox istifadə olunurlar. İzah et, nəyə görə tədqiqatçı öz tədqiqatlarında bu və ya başqa mikroskopiya metodunu seçməli olur.

2. Böyütmə istənilən tip mikroskopun mümkün olan ən əhəmiyyətli xassəsidir, amma onun rezolyusiyası, iki çox yaxın yerləşmiş əks obyektləri fərləndirməsi, daha çox əhəmiyyətlidir. Nəyə görə incə detalları görmək üçün mikroskopun həlletmə (rezolyusiya) gücünün onun böyütmə xassəsindən daha çox əhəmiyyətli olduğunu izah et. Mikroskopun linzalarının rezolyusiyasını təsvir etmək üçün hansı düsturdan istifadə edilir və düsturun qiymətlərində yerləşdirilmiş məhdudiyyətlər nədən ibarətdir?
3. Nəyə görə hüceyrə və toxumaların əsas işıq mikroskopu ilə vizuallaşdırılmasında kimyəvi rəngləmələr tələb olunur? Fluoressent boyalar və fluoressent mikroskoplar işıq mikroskopunda nümunənin kimyəvi rəngləmələri ilə müqayisədə hansı üstünlüklərə malikdir? Konfokal skanedici mikroskopiya və dekonvolusiya mikroskopiyası ənənəvi fluoressens mikroskopiya ilə müqayisədə hansı üstünlüklərə malikdir?
4. Müəyyən elektron mikroskopiya metodlarında nümunənin təsviri birbaşa alınmır. Bu metodlar hüceyrənin quruluşu barədə məlumatı necə təmin edir və onlar hansı tipdə quruluşu vizuallaşdırırlar? Elektron mikroskopiyasının əksər formaları üçün hansı məhdudiyyət vardır?
5. Hüceyrə ştammı, hüceyrə xətti və klonlar arasında fərq nədən ibarətdir?
6. İzah et, nəyə görə hüceyrə qovuşması prposesi tədqiqatlarda istifadə olunan monoklonal anticismlərin istehsalı üçün lazımdır.
7. Hüceyrə funksiyası barədə bizim biliklərimizin əksəriyyəti xüsusi hüceyrələrin və hüceyrənin spesifik hissələrinin (orqanoidlərin) istifadə edildiyi eksperimentlərdən asılıdır. Alimlər hüceyrələri və orqanoidləri mürəkkəb qatışıqlardan ayırmaq üçün hansı metodlardan çox istifadə edirlər və bu metodlar necə fəaliyyət göstərirlər?
8. Hoeçest 33258 kimyəvi boya olub canlı hüceyrələrdə xüsusilə DNT-yə birləşir və sonra UV işıqla həyacanlanaraq görünən işıq spektrində fluoressensiya edir. Hoeçest 33258–dən istifadə edən xüsusi bir metodu adlandır və təsvir et, onu tədqiqatçı hüceyrə tsiklinin G2 fazasındakı fibroblastı interfazada olan fibroblastlardan ayırmaq üçün istifadə edir.

İstinadlar

Hüceyrələrin Kulturada Yetişdirilməsi və Öyrənilməsi

Bissell, M. J., A. Rizki, and I. S. Mian. 2003. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**:753–762.

Davis, J. M., ed. 1994. *Basic Cell Culture: A Practical Approach*. IRL Press. Edwards, B., et al. 2004. Flow cytometry for high-throughput, high-content screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**:392–398.

Eggert, U. S., and T. J. Mitchison. 2006. Small molecule screening by imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**:232–237.

Goding, J. W. 1996. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry, and Immunology*, 3d ed. Academic Press.

Griffith, L. G., and M. A. Swartz. 2006. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:211–224.

Herzenberg, L. A., et al. 2002. The future and history of fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin. Chem*. **48**:1819–1827.

İşıq Mikroskopiyası: Hüceyrə Qurluşunun Öyrənilməsi və Hüceyrə Daxilində Zzülalların Vizuallaşdırılması

Egner, A., and S. Hell. 2005. Fluorescence microscopy with super-resolved optical sections. *Trends Cell Biol.* **15**:207–215.

Giepmans, B. N. G., et al. 2006. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**:217–224.

Huang, B., H. Babcock, and X. Zhuang. 2010. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell* **143**: 1047–1058.

Inoué, S., and K. Spring. 1997. *Video Microscopy*, 2d ed. Plenum Press.

Komatsu, N., et al. 2011. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol. Biol. Cell* **22**:4647–4656.

Lakadamyali, M. 2014. Super-resolution microscopy: going live and going fast. *Chem. Phys. Chem.* **15**:630636.

Lippincott-Schwartz, J. 2010. Imaging: visualizing the possibilities. *J. Cell Sci.* **123**:3619–3620.

Lippincott-Schwartz, J. 2011. Emerging in vivo analyses of cell function using fluorescence imaging. *Ann. Rev. Biochem.* **80**:327–332.

Matsumoto, B., ed. 2002. *Methods in Cell Biology*. Vol. 70: *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy.* Academic Press.

Mayer, T. U., et al. 1999. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* **286**:971–974.

Mayor, S., and S. Bilgrami. 2007. Fretting about FRET in cell and structural biology. In D. Zuk, ed., *Evaluating Techniques in Biochemical Research.* Cell Press.

Newman, R. H., M. Fosbrink, and J. Zhang. 2011. Genetically encoded fluorescent biosensors for tracking signaling dynamics in living cells. *Chem. Biol.* **115**:3614–3666.

Roukos, V., T. Misteli, and C. K. Schmidt. 2010. Descriptive no more: the dawn of high-throughput microscopy. *Trends Cell Biol.* **20**:503–506.

Schermelleh, L., R. Heintzmann, and H. Leonhardt. 2010. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* **190**:165–175.

Tsien, R. Y. 2009. Indicators based on fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Cold Spring Harbor Protoc.*, doi:10.1101/ pdb.top57.

Weigert, R., N. Porat-Shliom, and P. Amornphimoltham. 2013.Imaging cell biology in live animals: ready for prime time. *J. Cell Biol.* **201**:969–979.

Zipfel, W. R., R. M. Williams, and W. W. Webb. 2003. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnol.* **21**:1369–1377.

Elektron Mikroskopiyası: Yüksək-Rezolyusiyalı Təsvirlərin Alınması

Beck, M., et al. 2004. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* **306**: 1387–1390.

Frey, T. G., G. A. Perkins, and M. H. Ellisman. 2006. Electron tomography of membrane-bound cellular organelles. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struc.* **35**:199–224.

Hyatt, M. A. 2000. *Principles and Techniques of Electron Microscopy*, 4th ed. Cambridge University Press.

Koster, A., and J. Klumperman. 2003. Electron microscopy in cell biology: integrating structure and function. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:SS6–SS10.

Hüceyrə Orqanoidlərinin Ayrılması

Bainton, D. 1981. The discovery of lysosomes. *J. Cell Biol.***91**:66s–76s.

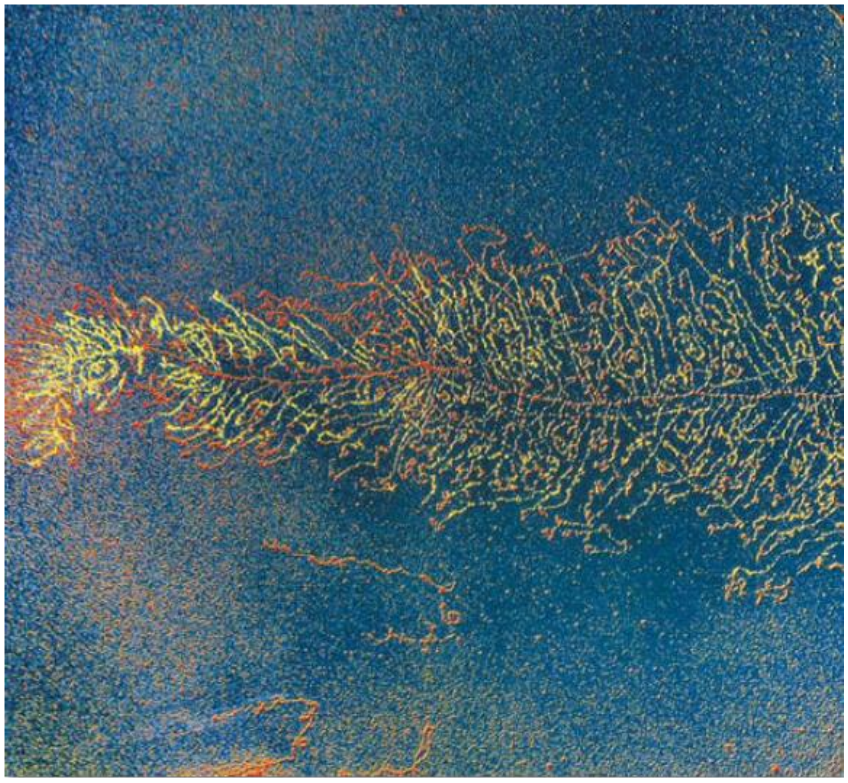
de Duve, C. 1975. Exploring cells with a centrifuge. *Science* **189**:186–194. The Nobel Prize lecture of a pioneer in the study of cellular organelles.

de Duve, C., and H. Beaufay. 1981. A short history of tissue fractionation. *J. Cell Biol.* **91**:293s–299s.

Foster, L. J., et al. 2006. A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell 125*:187–199.

Holtzman, E. 1989. *Lysosomes.* Plenum Press.

Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**:347–358. The Nobel Prize lecture of a pioneer in the study of cellular organelles.



***Xenopus* oositində ribosomal RNT transkripsiya vahidinin elektron mikrofotosu**. Transkripsiya soldan sağa doğru davam edir, yeni əmələ gəlmiş ribinukleoprotein komplekslər (rRNP-lər) ortada hər bir RNT polimeraza-I molerkulu DNT templeyt boyunca hərəkət etdikcə böyüyür (uzanır). Bu preparatda hər bir RNT transkripsiya prosesində mərkəzdə olan DNT zəncirindən ya aşağıya və ya yuxarıya doğru istiqamətlənir və nəticədə lələyə bənzər ümumi formanı yaradır. Canlı hüceyrənin nüvəciində yeni sintez olunan rRNP-lər, butılka yuyan fırçaya bənzər, bütün istiqamətlərdə genişlənir. [Professor Oscar L. Miller/science Photo library.]

FƏSİL

5

Fundamental Molekulyar Genetik Mexanizmlər

Zülalların fövqəladə universallığı hüceyrə quruluşunun müxtəlif komponentlərinin tərkibi kimi, hüceyrənin kataliz sistemi kimi, molekulyar keçiricilər və molekulyar maşınlar kimi 3-cü fəsildə təsvir edilmişdir. Biz bu fəsildə, zülalların necə əmələ gəldiyini, həmçinin orqanizmin və onun yaratdığı nəsillərin yaşaması üçün mühüm olan digər hüceyrə proseslərinin gedişini müzakirə edəcəyik. Bizim diqqətimiz nuklein turşuları kimi məlum olan və həyatı əhəmiyyətə malik olan molekullar üzərində cəmlənəcək və öyrənəcəyik ki, bu molekullar bütün hüceyrələrin funksiyalarının həyata keçirilməsini necə idarə edirlər. Bizim 2-ci fəsildə gördüyümüz kimi, nuklein turşuları xətti polimerlər olub dörd tip nukleotiddən təşkil olunmuşlar (Şəkil 2.13, 2.16, 2.17). Bu makromolekullar (1) hüceyrədə olan bütün zülalların aminturşu ardıcıllıqlarını təyin etmək üçün lazım olan informasiyanı və uyğun olaraq onların quruluş və funksiyaları barədə informasiyanı dəqiq nukleotid ardıcıllığı ilə özündə saxlayırlar, (2) hüceyrə quruluşunun makromolekulyar komponentlərinin əhəmiyyətli bir hissəsi olub polipeptid zəncirinin sintezi zamanı aminturşularının düzgün seçilməsini və ardıcıllıqda düzgün düzülməsini təmin edirlər, (3) hüceyrədə bir sıra fundamental kimyəvi reaksiyaları, o cümlədən zülal sintezi zamanı aminturşuları arasında peptid əlaqələrinin əmələ gəlməsini kataliz edirlər, və (4) genlərin ekspressiyasını tənzimləyirlər.

Dezoksiribonuklein turşusu (DNT) informasiya daşıyan molekul olub təşkil olunduğu nukleotid ardıcıllığında orqanizmdə olan bütün zülalların sintezi üçün lazım olan məlumatı, həmçinin bu orqanizmin ayrı ayrı hüceyrələri və toxumaları barədə məlumatı özündə daşıyır. Ən yaxşı halda bu funksiyalar molekulyar səviyyədə həyata keçirilir. O kimyəvi cəhətdən yer üzünün bir çox şəraitlərində həddən ziyadə stabildir, məsələn, on min illərlə yaşı olan toxuma və sümük qalıqlarından DNT ardıcıllığını ayırıb bərpa etmək mümkündür. Buna görə və canlı orqanizmlərdə onların özlərini bərpa etmək funksiyalarına görə DNT molekulunu təşkil edən bu uzun polimerlər 10^9 nukleotid cütü uzunluğa qədər ola bilirlər. Virtual olaraq mayalanmış insan yumurtalarının inkişaf edib trillionlarla xüsusiləşmiş hüceyrələrdən ibarət olan yetkin orqanizmə çevrilməsi üçün tələb olunan bütün informasiya dörd nukleotid ardıcıllığının təşkil etdiyi ~3×10^9 əsas cütündən ibarət insan genomunda saxlanılır. İrəlidə müzakirə olunan nukleotid əsaslarının cütləşməsi prinsiplərinə əsasən bu informasiyaların köçürülməsində baş verən səhvlər hər köçürülmüş 2.5×10^8 nukleotid üçün 1 olur. İstənilən növ üçün bu informasiyanın dəqiq replikasiyası onun nəsildən nəsilə genetik davam edən şəkildə ötürülməsinə zəmanət verir və bu xüsusiyyət fərdin normal inkişafı üçün kritik əhəmiyyət kəsb edir. DNT bu funksiyanı dəqiq həyata keçirdiyi üçün o, canlı orqanizmin bü-

QISA ICMAL

5.1 Nuklein turşularının quruluşu
5.2 Zülal-kodlaşdıran genlərin transkripsiyası və funksional mRNT-nin formalaşması.
5.3 mRNT kodlarının tRNT ilə açılması
5.4 Zülalların ribosomlarda mərhələli sintezi
5.5 DNT-nin replikasiyası
5.6 DNT-nin reparasiyası və rekombinasiyası
5.7 Viruslar: Hüceyrənin genetik sisteminin parazitləri.

tün məlum olan formalarında əsas informasiya daşıyıcısı rolunu oynayır (amma RNT tipli vuruslar istisna olmaqla, bunlar stabil DNT-dən fərqli olaraq müqayisəli dərəcədə az stabil olan qısa RNT genomu ilə məhdudlaşırlar, biz bunu irəlidə görəcəyik). Faktiki olaraq, canlı aləmin bütün formalarının öz genetik informasiyalarını kodlaşdırmaq üçün DNT-dən istifadə etmələrinin açılması və eyni genetik koddan istifadə etmələri göstəriri ki, həyatın bütün formaları öz əsaslarını genetik informasiyanı nuklein turşuları ardıcıllığı şəklində saxlayan ümumi bir əcdaddan götürüblər. DNT şəklində saxlanılan informasiyalar genlər kimi məlum olan irsiyyət vahidini təşkil edir, bunlar da orqanizmdə müəyyən əlamətlərə nəzarət edirlər. *Transkripsiya* prosesində, DNT-də saxlanılan məlumat xromatin quruluşunun, transkripsiyanın və zülal sintezinin tənzimlənməsində son zamanlar aşkar edilmiş funksiyalarına əlavə olaraq zülal sintezində üç fərqli rolu yerinə yetirən ribonuklein turşusuna (RNT) köçürülür, biz bunu 8, 9 və 10-cu fəsillərdə müzakirə edəcəyik.

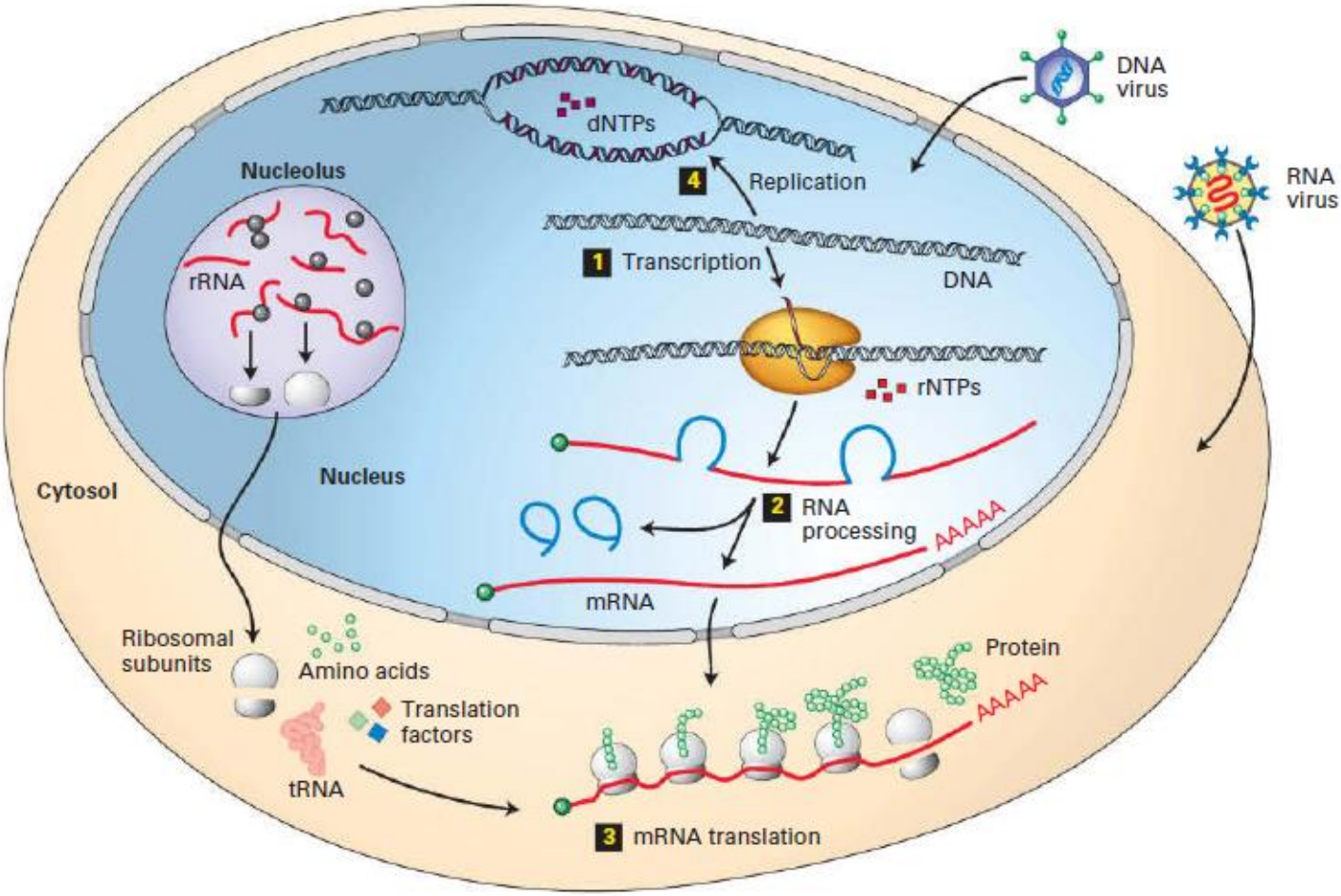
DNT nukleotid ardıcıllıqlarının bir hissəsinin surəti məlumat RNT (mRNT) molekuluna köçürülür, bunlar spesifik zülalların sintezini istiqamətləndirir. mRNT molekulunun nukleotid ardıcıllığı zülalların sintezi zamanı amin turşularının düzgün ardıcıllığını təmin edən informasiyaya malikdir. Amin turşularının çox dəqiq və mərhələli şəkildə zülal molekulunda toplanması (assembling) mRNT translyasiyası yolu ilə həyata keçirilir. Bu prosesdə mRNT molekulunun nukleotid ardıcıllığı nəqliyyat RNT adlandırılan (tRNT) ikinci tip RNT molekulu tərəfindən üçüncü tip RNT molekulu, ribosomal RNT (rRNT) mlekulunun və onlarla assosasiyada olan zülalların köməyi ilə "oxunur". Düzgün amin turşuları tRNT-lər vasitəsi ilə ardıcıllığa gətirilən kimi onlar peptid əlaqələrinə girərək zülalı (polipeptidi) əmələ gətirirlər. RNT-nin sintezi transkripsiya adlanır, çün ki, DNT-nin dörd-əsaslı ardıcıllıqdan ibarət olan "dilinin" surəti tamamilə dəqiq şəkildə mRNT molekulunun nukleotid ardıcıllığına köçürülür və ya *transkripsiya* olunur. Zülal sintezi isə "translyasiya" kimi ifadə olunur, çün ki, informasiya DNT-nin və RNT-nin dörd-saslı nukleotid ardıcıllığı "dilindən" zülalın iyirmi-aminturşu ardıcıllığı "dilinə" translyasiya - "tərcümə" olunur, keçirilir.

1953-cü ildə DNT quruluşunun açılması və uyğun olaraq RNT sintezinin DNT üzərində necə istiqamətləndiyinin öyrənilməsi, sonra da zülal toplanmasının (assembling) həyata keçirilməsi - ***mərkəzi doqma*** adlandırılan bu proses "əbədiləşdirilmiş nailiyyət" kimi molekulyar biologiyanın ilk dövrünü əmələ gətirmişdir. Amma, mərkəzi doğmanın DNT→RNT→Zülal kimi sadələşdirilmiş təsviri nuklein turşularının sintezində zülalların rolunu əks etdirmir. Bundan əlavə, burada bakterialar üzərində və sonrakı fəsillərdə eukariotlarda müzakirə olunduğu kimi, genlərin ekspressiyasının *tənzimlənməsi* üçün zülallar geniş mənada əsas faktorlardır, bütünlükdə proses "düzgün" hüceyrədə inkişafın "düzgün" zamanında DNT-də kodlaşdırılmış informasiya zülal şəkilinə çevrilir (decoded). Nəticədə, hemoqlobin yalnız qırmızı qan hüceyrələrinin (eritrositlərin) dövrə etməsi üçün müəyyən olunmuş sümük iliyi hüceyrələrində (eritroid əcdad hüceyrələrdə) ekspressiya olunur, insan beynində inkişaf etməkdə olan neyronlar isə digər inkişaf etməkdə olan 10^{11} neyronla düzgün sinaps əlaqələri yaradırlar. Fundamental molekulyar proseslər, DNT-nin replikasiyası, transkripsiya və translyasiyası istər eukariotlarda, istərsə də prokariotlarda orqanizmin düzgün kompleks şəkildə inkişaf etməsi üçün son dərəcə dəqiq, sürətli və düzgün tənzimlənmə ilə aparılmalıdır (bax Şəkil 1-1).

Buna, hər bir mərhələdə yeni mərhələ başlamazdan öncə əvvəlkinin dəqiq getməsini yoxlayan, çox mərhələli yoxlama və ya nəzarət mexanizmlərinin iştirakı ilə son dərəcə dəqiqliklə aparılmış kimyəvi proseslə nail olunur. Çoxhüceyrəli orqanizmlərin inkişafı üçün lazım olan genlərin yüksək və ciddi şəkildə tənzimlənmiş ekspressiyası inkişafda olan orqanizmlərdə uzaq məsafədəki hüceyrələrdən göndərilmiş, eləcə də qonşu hüceyrələrdən göndərilmiş siqnallar haqqında informasiyaların və embriogenezin əvvəlki mərhələlərində, həmçinin hüceyrənin əcdadları tərəfindən təyin olunmuş daxili inkişaf proqramı haqqında informasiyaların inteqrasiyasını tələb edir. Bütün bu proseslər, hər bir genin ekspressiyasını koordinasiya edən DNT-dəki nəzarət ardıcıllıqlarından və onlarla birgə fəalliyyət göstərən ***transkripsiya faktorları*** adlandırılan zülallardan asılıdır. 8, 9 və 10-cu fəsillərdə müzakirə olunan, RNT ardıcıllıqları həmçinin xromatin quruluşunun, transkripsiyanın, RNT prosessinqinin və translyasiyanın tənzimlənməsinə xidmət edir. Nuklein turşuları hüceyrənin "beyni və mərkəzi sisnir sistemi" kimi fəaliyyət göstərir, zülallar isə bu funkiyaların həyata keçməsini yerinə yetirir.

Bu fəsildə biz, birincisi DNT və RNT molekullarının quruluşuna və xassələrinə baxacağıq və göstərəcəyik ki, müxtəlif xüsusiyyətlərə malik olan bu iki tip nuklein turşusu hüceyrə daxilində öz spesifik funksiyalarını necə yerinə yetirir. Növbəti bir neçə bölmədə Şəkil 5-1-də göstərilmiş ümumiləşdirilmiş əsas proseslərin gedişini müzakirə edəcəyik, bunlardan: DNT-nin RNT sələflərə transkripsiyası, bu sələflərin prosesinqi və funksional RNT molekulunun alınması, mRNT molekulunun zülala translyasiyası və DNT-nin replikasiyası. Zülallar hüceyrənin quruluşunu və hüceyrədə əksər biokimyəvi prosesləri tənzimləyir, ona görə də ilkin olaraq biz zülaların üç-ölçülü quruluşunu müəyyən edən və uyğun olaraq onların funksionallığını təmin edən amin turşularının düzülmə ardıcıllığının DNT-də necə kodlaşdırıldığına və translyasiya olunduğuna baxırıq. mRNT, tRNT və rRNT molekullarının zülal sintezində funksiyalarının ümumi təsvirindən sonra biz komponentlərin geniş və dəqiq təsvirini və translyasiyanın biokimyəvi mərhələlərini veririk. Bu proseslərin başa düşülməsi bizə imkan verir ki, informasiyanın DNT-nin nukleotid ardıcıllığından zülala necə dəqiqliklə köçürüldüyünü qiymətləndirək. Bu səbəbdən, biz növbəti pillədə DNT replikasiyasına daxil olan molekulyar mexanizmi və genetik materialın surətini dəqiq (səliqəli) şəkildə köçürən kompleks hüceyrə mexanizminin gedişini müzakirə edirik. Müzakirə boyu

biz, bu prosesləri eukariotlarda və prokariotlarda müqayisə edirik. Növbəti bölmədə biz, DNT-də olan zədələnmələrin necə bərpa olunmasını (reparasiya) və **rekombinasiya** prosesində müxtəlif DNT molekullarının ayrı-ayrı rayonlarının mübadilə olunmasını və növ daxilində fərdi orqanizmdə əlamətlərin yeni kombinasiyasının əmələ gəlməsini müzakirə edirik. Bu fəsilin sonuncu bölməsi DNT replikasiyası, transkripsiya, və zülal sintezi kimi hüceyrə mexanizmlərini istismar edən viruslar və parazitlər barədə əsas məlumatı təqdim edir. Bundan əlavə, güclü patogen olmaqla yanaşı, viruslar həm də, hüceyrədə makromolekulların sintezinin və bir sira başqa hüceyrə mexanizmlərinin öyrənilməsində əhəmiyyətli model orqanizmlərdir. Viruslar hüceyrələrlə müqayisədə daha sadə quruluşa malikdirlər və onların kifayət qədər kiçik genomu əsas hüceyrə proseslərinin öyrənilməsinə imkan verir. Viruslar bu gün də hüceyrənin molekulyar biologiyasında mühüm dərsləri öyrətməkdə davam edir və hal hazırda insanın gen terapiyasında uğurla istifadə olunan, istənilən genin hüceyrə daxilinə keçirilməsi kimi proseslərdə eksperimental alətlər kimi uyğunlaşdırılmışdırlar.



Şəkil 5-1. Əsas molekulyar genetik proseslərin ümumi gedişi. Bu fəsildə biz, zülalların sintezini aparan üç prosesin gedişini (1- 3) və DNT-nin replikasiyası prosesini (4) izah edirik. Viruslar sahib orqanizmin aparatından istifadə etdiyindən onlar bu proseslərin öyrənilməsi üçün əhəmiyyətli modeldirlər. RNT-polimeraza ilə zülal kodlaşdıran genin transkripsiyası zamanı (1) zülalın aminturşu ardıcıllığını dəqiq müəyyən edən dörd-əsaslı DNT kodun surəti ribonukleotid trifosfat monomerlərin (rNTP) polimerləşməsi ilə sələf məlumat RNT (sələf-mRNT) molekuluna köçürülür və ya ***transkripsiya*** olunur. Ümumilikdə, RNT-prosessinqi kimi məlum olan sələf-mRNT-dən kodlaşdırmayan ardıcıllıqların uzaqlaşdırılması (atılması) və başqa modifikasiyalar (2) funksional mRNT molekulunu yaradır, bu da sitoplazmaya daşınır. ***Translyasiya*** zamanı (3) mRNT-nin dörd-əsasdan təşkil olunmuş kodu 20 amin turşusunun yaratdığı ***zülal dilinə tərcümə*** olunur (çevrilir). mRNT kodunu translyasiya edən makromolekulyar maşınlar ribosomlar nüvəcikdə ribosomal RNT (rRNT) molekulları ilə çoxsaylı müxtəlif zülallardan (*sağda*) yığılmış iki subvahiddən təşkil olunmuşdurlar. Sitoplazmaya daşındıqdan sonra ribosom subvahidləri mRNT ilə birləşirlər və nəqliyyat RNT-lərin (tRNT) və müxtəlif translyasiya faktorlarının köməyi ilə zülalın sintezini həyata keçirirlər. Yalnız bölünməyə hazırlaşan hüceyrələrdə baş verən DNT replikasiyası zamanı (4), dezoksiribonukleozid trifosfat monomerlər (dNTF-lər) polimerləşərək xromosomal DNT molekulunun iki identik nusxəsini (kopyasını) əmələ gətirirlər. Hər yeni əmələ gəlmiş qız hüceyrə bu nüsxələrdən birini alır.

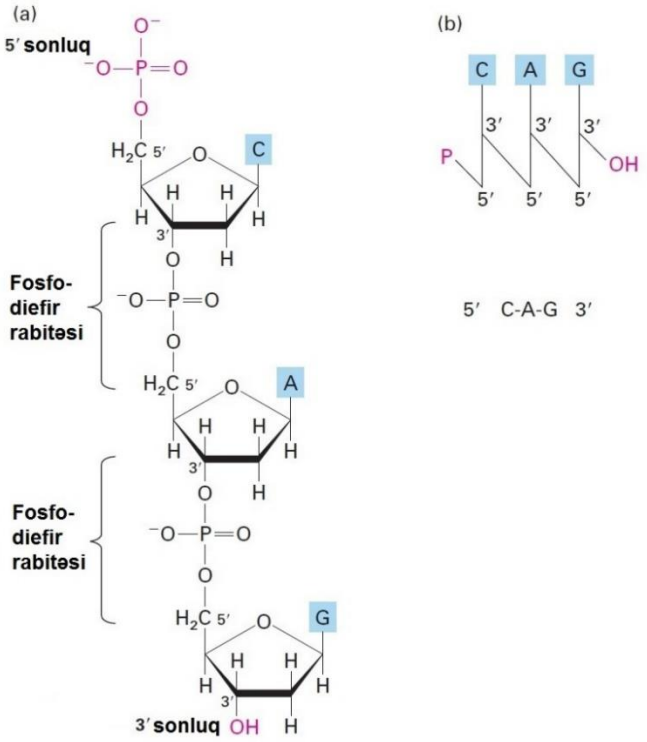
5.1 Nuklein Turşularının Quruluşu

DNT və RNT kimyəvi tərkibinə görə çox oxşardırlar. Hər ikisinin ilkin quruluşu **nukleotidlər** adlandırılan **monomerlər**dən təşkil olunmuş xətti polimerdir. DNT və mRNT ilkin informasiya molekullarıdırlar, öz dəqiq nukleotid ardıcıllıqları barədə informasiyanı daşıyırlar. Hüceyrə RNT-ləri ölçüsünə görə 22 nukleotiddən ibarət kiçik uzunluqdan bir neçə min nukleotidə qədər böyük uzunluqda olurlar. Hüceyrənin DNT molekulları isə bir neçə yüz million nukleotid uzunluğa qədər ola bilirlər. Bu cürə böyük DNT vahidləri zülallarla assosasiya etmiş halda boyalarla rənglənə bilir və **xromosomlar** şəklində işıq mikroskopu altında görünə bilirlər, rənglənməsinə görə də onlar bu cürə adlandırılmışdır. Baxmayaraq ki, kimyəvi tərkibinə görə DNT və RNT molekulları çox oxşardırlar, amma onlar bir sıra çox əhəmiyyətli fərqlərə malikdirlər. Məsələn, RNT katalitik molekul kimi də funksiyaya malik ola bilir. Bizim irəlidə müzakirə edəcəyimiz kimi, DNT və RNT molekullarının fərqli və unikal xassələri onların hüceyrədə öz xüsusiyyətlərinə uyğun spesifik rolu yerinə yetirmələrinə imkan verir.

Nuklein Turşusu Zəncirləri Ucdan-Uca Ynəlmiş Xətti Polimerdir

Bütün orqanizmlərdə, DNT və RNT hər biri yalnız dörd müxtəlif nukleotiddən təşkil olunub. Fəsil 2-dən yada salaq ki, bütün nukleotidlər üzvi əsasdan, ona birləşmiş beş karbonlu şəkərdən və onun 5-ci karbon atomuna birləşmiş fosfat qrupundan ibarətdirlər. RNT-də şəkər qalığı ribozadır, DNT-də isə dezoksiribozadır (bax Şəkil 2-16). DNT və RNT-nin sintezində iştirak edən nukleotidlər beş müxtəlif əsasdan təşkil olunmuşlar. *Adenin* (A) və *quanin* (G) əsasları **purindirlər,** bunlar, bir-birinə birləşmiş iki həlqəyə malikdirlər; s*itozin* (C), *timin* (T), və *urasil* (U) **pirimidindirlər,** və bir həlqəyə malikdirlər (bax Şəkil 2-17). Bu əsaslardan üçü - A, G və C həm DNT həm də RNT molekullarında tapılmışdır, amma T yalnız DNT molekulunda tapılmışdır, U isə yalnız RNT molekulunda tapılmışdır. (Qeyd etmək lazımdır ki, bu əsasların qısaldılmış bir hərflə göstərilmiş işarələri genomda mövcud nuklein turşularında nukleotidlərin göstərilməsində ümumi istifadə olunur.)

Tək nuklein turşusu zənciri pentoza-fosfat vahidlərinin təkrarından təşkil olunmuş ***özül***ü (*backbone)* əmələ gətirirlər, onlardan da purin və pirimidin əsasları yan qruplar kimi uzanırlar. Polipeptidlərdə olduğu kimi nuklein turşularında ucdan-uca kimyəvi ynəlmə (orientasiya) mövcuddur: adətən **5′-*sonluq*** terminal şəkərin 5′-karbonunda hidroksil və ya fosfat qrupuna malik olur, **3′-*sonlugun***da isə 3′ terminal carbonunda hidroksil qrupuna malik olur (Şəkil 5-2). Bu cürə istiqamətləndirmə və üstə gəl sintezin 5′→3′ istiqamətində (soldan sağa doğru) getməsi faktı belə bir konvensiyanın yaranmasına səbəb oldu ki, polinukleotid ardıcıllıqlar 5′→3′ istiqamətində (soldan sağa) yazılır və oxunur, məsələn, AUG ardıcıllığı (5′)AUG(3′) kimi anlaşılır. İrəlidə görəcəyik ki, nuklein turşusu zəncirlərinin 5′→3′ kimi istiqamətlənməsi molekulun əhəmiyyətli xüsusiyyətlərindən biridir. Bir-birinə yaxın yerləşən qonşu nukleotidlər arasındakı, umumilikdə **fosfodiefir əlaqəsi** adlanan kimyəvi rabitələr, sözün əsil mənasında, iki fosfodiefir əlaqəsindən ibarətdir, biri fosfatın 5′ tərəfində digəri isə 3′ tərəfində yerləşir.



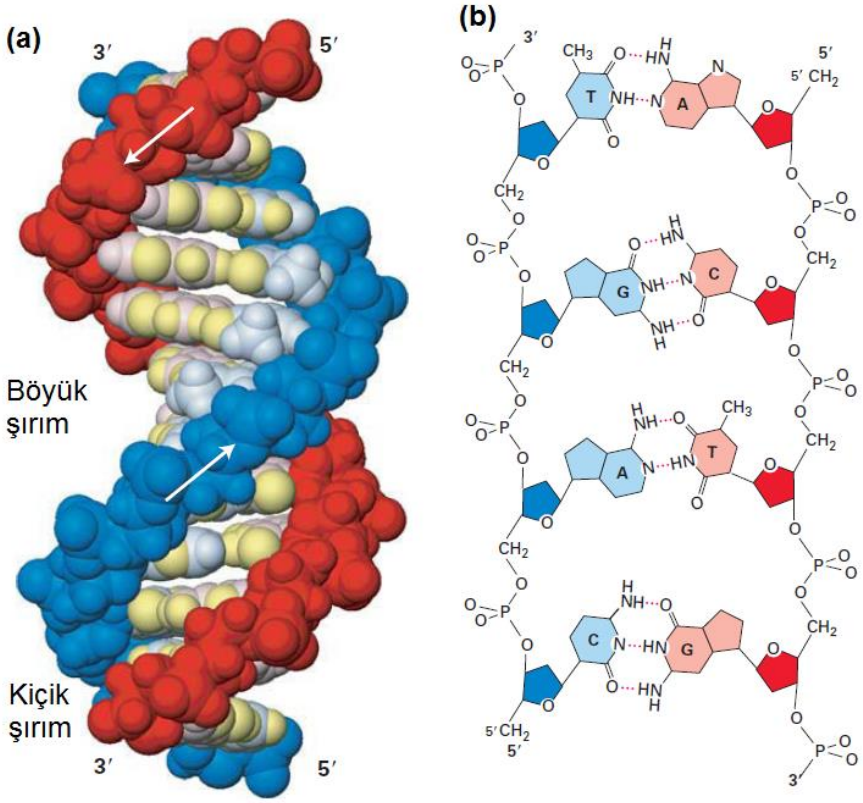
Şəkil 5-2 Nuklein turşusu zəncirinin kimyəvi istiqamətlənməsi. Burda göstərilən, DNT-nin bir spirallı alternativ təsviri yalnız üç nukleotiddən ibarətdir: sitozin (C), adenin (A), və quanin (G). (a) Kimyəvi quruluş hidroksil qrupunun 3′ sonluqda və fosfat qrupunun 5′ sonluqda olduğunu göstərir. Həmçinin, qeyd etmək lazımdır ki, fosfodiefir əlaqələri bir-birinə toxunan yaxın nukleotidləri birləşdirir, bu iki birləşmə əlaqələri ümumilikdə ***fosfodiefir əlaqələri*** adlandırılır. (b) Çubuq diaqramında (*yuxarıda*) şəkər qalıqları vertikal xətlərlə göstərilmişdir və fosfodiefir əlaqələri isə onlar arasında çəp (aşan) xətlərlə verilmişdir; əsaslar isə onların qısaldılmış bir hərfli adlandırmaları ilə göstərilmişdir. Ən sadə təsvirdə (*aşağıda*) yalnız əsaslar göstərilmişdir. Qəbul olunmuş konvensiyaya görə polinukleotid ardıcıllıq qeyd olunmuş xüsusi hallar istisna olmaqla yalnız 5′→3′ istiqamətində yazılır (soldan sağa doğru).

Nukleotidlərin fosfodiefir əlaqələri ilə birləşmiş xətti ardıcıllığı nuklein turşularının *ilkin quruluşunu* təşkil edir. Polipeptidlərdə olduğu kimi, polinukleootidlər də (spiral kimi) burula bilir və qeyri kovalent əlaqələri ilə stabilləşən üç-ölçülü konformasiyaya keçir. Baxmayaraq ki, DNT və RNT molekullarının ilkin quruluşları əsasən oxşardırlar, onların üç-ölçülü konformasiyaları kifayət qədər fərqlidir. Bu quruluş fərqləri iki tipdə olan bu nuklein turşularının funksiyalarında kritik əhəmiyyət kəsb edir.

Nativ DNT komplementar antiparalel zəncirlərin yaratdığı ikiqat spiraldır

Molekulyar biologiyanın müasir erası 1953-cü ildə Ceyms D. Uotsonun və Fransis H.C. Krikin DNT-nin ikiqat spiral quruluşu haqqında təqdimatından sonra başlandı. Onların təqdimatı Rozalind Franklin və Maurice Uilkinsin yaratdığı DNT zəncirlərinin (liflərinin), quruluşunun spiral şəkilində olmasını göstərən rentgen-difraksiya analizlərinə və Ervin Çarqaf və

əməkdaşlarının çoxsaylı müxtəlif orqanizmlərdə DNT-nin nukleotid əsaslı tərkibinin analizlərinə əsaslanmışdır. Çarqafın tədqiqatları göstərmişdir ki, bir-birindən uzaq olan orqanizmlər arasında DNT-nin nukleotd əsaslı tərkibi (təqdim olunan A, T, G və C) həddən artıq dəyişilir, bütün orqanizmlərdə mövcud olan A miqdarı həmişə onlarda T miqdarı ilə bərabərdir və mövcud olan G miqdarı həmişə C miqdarı ilə eynidir. Bu kəşfə və dörd nukleotidin tərkib quruluşuna əsaslanaraq Uotson və Krik diqqətlə DNT-nin dəqiq molekulyar quruluşunu yaratdılar və ikiqat spiral quruluşu təklif edərək göstərdilər ki, ikiqat spiralın mərkəzi oxu ətrafında A həmişə hidrogen rabitə vasitəsilə T-yə, G isə həmişə hidrogen rabitəsi ilə C-yə birləşir. Uotson və Krikin modeli doğru oldu və DNT-nin genetik material kimi necə fəaliyyət göstərməsi istiqamətində müasir anlayışlarımıza yol açdı. Bu gun bizim DNT-nin quruluşu haqqında daha dəqiq modelimiz, DNT kristallarının yüksək rezolyusiyalı rentgen-diffraksion tədqiqatlarına əsaslanır, çoxlu miqdarda, tez kristallaşa bilən, bərabər uzunluqlu və unikal ardıcıllıqlı qısa DNT molekullarının kimyəvi yolla sintez edilməsi mümkün oldu (Şəkil 5-3a).



ŞƏKIL 5-3 DNT-nin ikiqat zənciri. (a) DNT-nin doldurulmuş fəza modeli hüceyrədə ən çox tapılmış DNT formasıdır. Əsaslar (açıq rənglənmiş) hər zəncirin şəkər-fosfat özülündən (tünd göy və qırmızı rənglər) spiralın içərisinə doğru uzanmışdır, amma onların qırağı böyük və kiçik şırımlarda tutula biləndir. Ox işarələri hər zəncirin 5'→ 3' istiqamətidir. Əsaslar arasındakı hidrogen əlaqələri quruluşun mərkəzindədir. Böyük və kiçik şırımlar potensial hidrogen rabitəli donorlar və akseptorlarla (sarı rınglə nişanlanmışdır) örtülmüşdür. (b) DNT-nin ikiqat spiralının kimyəvi quruluşu. Bu genişlənmiş sxem iki şəkər-fosfat özülünü və Uotson-Krik əsasları: A-T və G-C arasındakı hidrogen əlaqələrini göstərir. Bax R. E. Dickerson, 1983, *Sci. Am.* **249**:94. [(a) hissə verilənlər R. Wing et al., 1980, *Nature* **287**:755, PDB ID 1bna.]

DNT bir-birinə sarılaraq ikiqat spiral əmələ gətirən iki polinukleotid zəncirin assosasiyasından ibarətdir. İki şəkər-fosfat özülü ikiqat spiralın kənar (xaric) tərəfində yerləşir və əsaslar isə spiralın daxilinə uzanır. Hər bir zəncirdə bir-birinə toxunan əsaslar paralel müstəvidə biri o birinin üstündə oturur (bax Şəkil 5-3a). İki zəncirin orientasiyası *antiparaleldir*, yəni hər iki zəncirin 5′→3′ istiqaməti bir-birinin əksinədir. İki zəncir arasında nukleotid cütlərinin əmələ gəlməsi nəticəsində zəncirlər dəqiq şəkildə dayanırlar: burada A iki hidrogen rabitəsi vasitəsilə T ilə cütləşir və G isə üç hidrogen rabitəsiylə C ilə cütləşir (Şəkil 5-3b). Bu əsas cütlərinin komplementarlığı əsasların ölçüsünə, formasına və kimyəvi tərkiblərinin nəticəsinə görə yaranır. DNT molekulunda minlərlə bu cürə hidrogen rabitələrinin olması ikiqat zəncirin stabilliyini təmin edir. Bir-biri ilə birləşmiş əsaslar arasındakı hidrofob və VanderVaals qüvvələrinin yaratdığı qarşılıqlı əlaqə ikiqat zənciri daha da stabilləşdirir.

Təbii DNT molekulunda, şəkil 5-3b-də göstərildiyi kimi, A həmişə hidrogen rabitəsiylə T ilə və G isə C ilə birləşərək A-T və G-C əsas cütlərini əmələ gətirirlər. Böyük purin və kiçik pirimidin əsasları arasındakı bu assosasiya çox vaxt ***Uotson-Krik əsas cütləri*** adlandırılır. İki polinukleotid zəncirlər və ya onların bütün nukleotidlərinin belə əsas cütləri əmələ gətirən rayonları **komplementar** adlanır. Amma nəzəri olaraq və sintetik DNT-lərdə başqa əsas cütləri də əmələ gələ bilir. Məsələn, quanin (purin əsası) nəzəri olaraq timinlə də (pirimidin) əsas cütü yarada bilir, nəticədə spiralda normal haldan cüzi kəralanmaların (pozulmaların) yaranmasına səbəb olur. Spiralda həmçinin iki pirimidin sitozin və timin arasında da əsas cütlərin əmələ gəlməsi mümkündür. Hərçənd ki, qeyri-standart G-T və C-T əsas cütləri normal olaraq təbiətdə DNT-də tapılmamışdır, amma G-U əsas cütləri bir zəncirli RNT-nin əmələ gətirdiyi ikizəncvirli rayonlarında tez-tez rast gəlinən ümumi haldır. Qeyri standart əsas cütləri təbii olaraq dupleks DNT-də də rast gəlinmir, çünki irəlidə bu fəsildə təsvir edəcəyimiz, DNT surətini yaradan (sintez edən) ferment onlara imkan vermir.

Hüceyrədə əksər DNT molekulları ***sağa burulan*** spiraldır.

DNT-nin rentgen-diffraksiya profili göstərir ki, əsasların zəncirdə yığılması adətən spiralın mərkəzi oxu boyu 0.34 nm məsafədə yerləşirlər. Spiral ardıcıllıqdan asılı olaraq hər 3.4 nm-dən 3.6 nm qədər məsafədə tam bir dövrə edir. Beləliklə tam bir dövrədə 10-10.5 əsas cütü yerləşir. Bu DNT-nin ***B forması*** adlandırılır və normal forma olub hüceyrədə yayılan DNT molekullarının əksəriyyətində rast gəlinir. B-formalı DNT spiralının kənarında, bir-birinə sarınmış zəncirlərin arasındakı sahə, bir-birindən dərinliyinə və genişliyinə görə fərqlənən iki spiral şırımı əmələ gətirir və bunlar ***böyük şırım*** və ***kiçik şırım*** kimi qeyd olunur (Şəkil 5-3a). Bunun nəticəsi olaraq, bu şırımlar daxilində hər bir əsasın kənarında olan atomlar zəncir xaricindən asan əldə oluna biləndirlər və iki tip birləşmə səthini yaradırlar. DNT birləşdirən zülallar, istər kiçik istərsə də böyük şırımlarda atomlara toxunaraq dupleks DNT-də əsasların bu ardıcıllığını "oxuya" bilirlər.

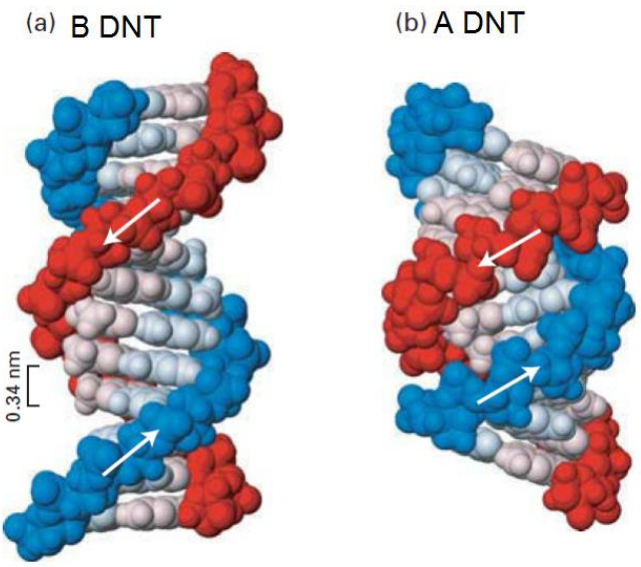
Suyun əsas hissəsinin DNT-dən çıxarıldığı laboratorya şəraitində, DNT-nin kristalloqrafik quruluşu ***A formasına*** dəyişilir, bu formalı DNT B-formalı DNT-yə nisbətən daha enli və qısadır, geniş və dərin böyük şırıma və daha dar və dayaz kiçik şırıma malik olur (Şəkil 5-4). RNT-DNT və RNT-RNT zəncirləri də, hüceyrədə və in vitro bu formada mövcud olurlar.

Standart B-formalı DNT-nin quruluşunda əhəmiyyətli modifikasiyalar zülalların xüsusi DNT saytlarına birləşməsi nəticəsində əmələ gəlir. Baxmayaraq ki, əsaslar arasındakı çoxsaylı hidrogen və hidrofob əlaqələr DNT molekuluna sabitlik verrir, yenə də ikiqat spiral özünün uzun mərkəzi oxu ətrafında dəyişkəndir. Zülallardakı α spiraldan fərqli olaraq (bax şəkil 3-4), DNT spiralında mərkəzi oxa parallel hidrogen əlaqələri yoxdur. Bu xassə, DNT birləşdirən zülallarla kompleks əmələgəlmə zamanı DNT molekulunun əyilməsinə imkan verir (Şəkil 5-5). DNT molekulunun əyilməsi onun xromatin quruluşunda sıx bükülməsi üçün kritik əhəmiyyətlidir, bu kompleks eukariotlarda nüvə DNT-sinin rast gəlindiyi zülal-DNT kompleksdir (bax Fəsil 8).

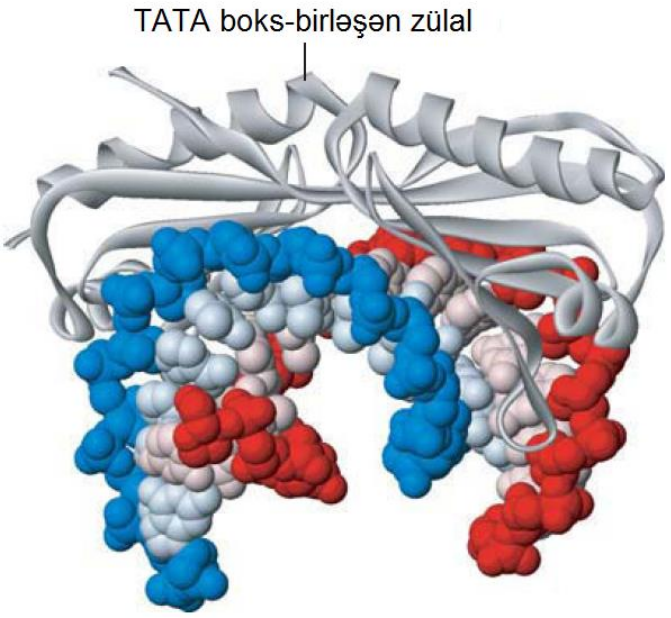
Nə üçün təkamül proesində RNT deyil, məhz DNT hüceyrədə genetik informasiyanın daşıyıcısı kimi yaranmışdlır? DNT molekulunda dezoksiriboza qalığının 2′ karbon atomundakı hidrogen ona 2′ riboza vəziyyətində hidroksil qrupu olan RNT molekuluna nisbətən daha çox sabitlik verir (bax Şəkil 2-16). RNT molekulundakı 2′-hidroksil qruplar fosfodiefir əlaqələrinin neytral pH mühitində zəif, OH^--ilə kataliz olunan hidrolizlərində iştirak edir (Şəkil 5-6). DNT-də 2′-hidroksil qrupunun olmaması bu prosesə mane olur. Ona görə də DNT-də dezoksiribozanın olması onu daha sabit molekul edir – bu da xarakterik olaraq onun genetik informasiyanı üzün müddətə saxlamaq və daşımaq qabliyyəti üçün kritik əhəmiyyət kəsb edir.

DNT Geriyə Dönən Zəncir Ayrılmasına Uğraya Bilir

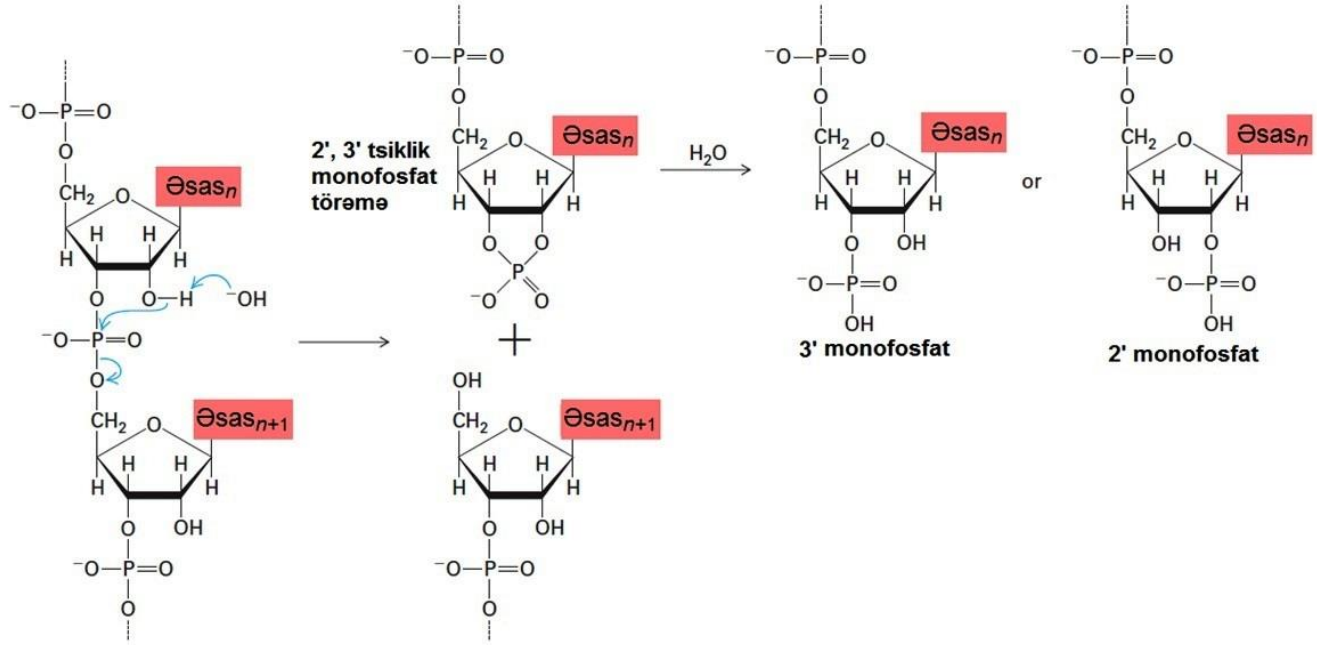
DNT-nin replikasiyası və transkripsiyası zamanı ikiqat spiralın zəncirləri ayrılmalıdır ki, əsasların daxili kənarlarının polimerləşməkdə olan nukleotidlərin əsasları ilə cütləşməsinə imkan versin. Sonrakı bölmələrdə biz transkripsiya və replikasiya zamanı DNT zəncirlərini ayıran və sonra yenidən birləşdirən hüceyrə mexanizmlərini izah edirik. Burada biz, DNT zəncirlərinin ayrılmasına və yenidən birləşməsinə təsir edən fundamental faktorları müzakirə edirik. DNT-nin bu xüsusiyyəti *in vitro* təcrübələr vasitəsi ilə tədqiq olunmuşdur.



ŞƏKIL 5-4 A-Forma və B-Forma DNT-nin müqayisəsi. İki polinukleotid zəncirin şəkər-fosfor özülləri, hər iki quruluşun xaricində qırmızı və göy rənglə göstərilmişdir; əsaslar (daha açıq rəngli kölgələr) içəriyə doğru uzanmışdır. (a) DNT-nin B formasında spiralın hər burumuna ~10.5 əsas cütü daxil olur. Bir-birinə yaxın olan birləşmiş əsas cütlər bir-birindən 0.34 nm məsafədədir. (b) DNT-nin daha kompakt olan A forması spiralın hər burumunda 11 əasas cütünə malikdir, B forma ilə müqayisədə daha dərin böyük şırıma və daha dayaz kiçik şırıma malikdir. [(a) hissəsi verilənlər R. Wing et al., 1980, *Nature* **287**:755, PDB ID 1bna. (b) hissəsi verilənlər B. N. Conner et al., 1984, *J. Mol. Biol.* **174**:663, PDB ID 1ana.]

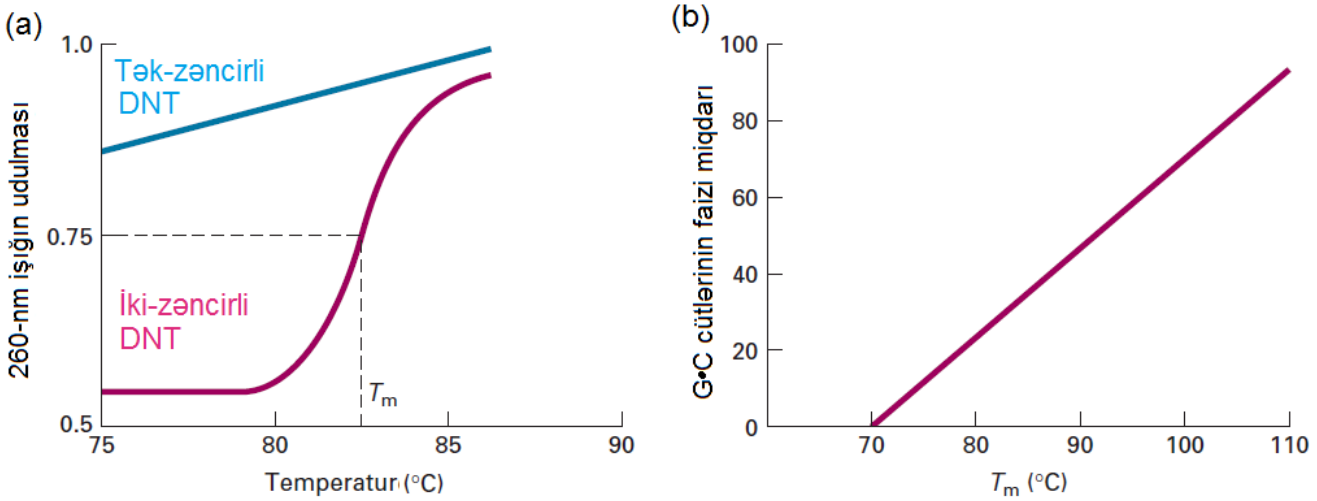


Şəkil 5-5 Zülallarla qarşılıqlı əlaqə DNT-nin əyilməsinə səbəb olur. TATA-boks birləşdirən zülalların (TBP) konservativ C terminal domeni A və T ilə zəngin xüsusi DNT ardıcıllığında olan kiçik şırıma oturur və həmin nahiyədə DNT-nin ikiqat zəncirinin açılmasına və onun kəskin şəkildə əyilməsinə səbə olur. Eukariot genlərinin çoxunun transkripsiyası TBP-nin iştirakını tələb edir. [D.B.Nikolov və S.K. Burley, 1977, PNAS-USA 94:15 PDB ID 1cdw.]



Şəkil 5-6 RNT-nin əsasla kataliz olunan hidrolizi. RNT-də 2′ hidroksil qrupu fosfodiefir əlaqələrinə hücum edən nukleofill kimi təsir edə bilir. 2′,3′-tsiklik monofosfatın törəmələri sonra 2′ və 3′ monofosfatlara hidroliz olunur. Fosfodiefirlə bağlı olan hidrolizin mexanizmi DNT üçün mümkün deyil, çünki onlarda 2′-hidroksil qrupu yoxdur.

DNT-nin **denatrurasiyası** və ya "**əriməsi**" kimi anlaşılan, DNT-də ikiqat zəncirin açılması və ayrılması DNT məhlulunun temperaturunu qaldırmaqla eksperimental olaraq induksiya olunur. Termal enerji artdıqca molekulların hərəkəti də artır və tədricən ikiqat spiralı stabilləşdirən hidrogen rabitələrini və başqa qüvvələri qırır. Sonra zəncirlər ayrılır, hər iki zəncirin mənfi yüklənmiş dezoksiriboza-fosfat özülü elektrostatik itələmə nəticəsində bir-birindən uzaqlaşır. Denaturasiya temperaturuna yaxın istilikdə, temperaturun çox cüzi artması, verilmiş DNT molekul boyunca zəncirləri bir yerdə (cütləşmiş şəkildə) saxlayan çoxsaylı müxtəlif, zəif qarşılıqlı əlaqələrin eyni vaxtda tez və sürətlə itirilməsinə səbəb olur. DNT-nin ikiqat zəncirində ardıcıl düzülmüş əsas cütləri ultrabənövşəyi (UV) işıq dalğalarını bir qatlı zəncirdə açılmış ardıcıllıqdakı əsaslara nisbətən az udduğundan bu dəyişilmə udma spektrində qırıq-qırıq kəskin yüksəlmələrə səbəb olur, bu fenomen DNT-nin *hiperxromluğu* adlanır (Şəkil 5-7a).



EKSPERIMENTAL ŞƏKIL 5-7 DNT-nin G-C tərkibi ərimə temperaturuna təsir edir. DNT-nin denaturasiya etdiyi temperatur G-C tərkibinə proporsional olaraq artır. (a) İkiqat zəncirli DNT-nin əriməsi 260 nm dalğa uzunluqlu ultrabənövşəyi işığın udulması ilə təyin oluna bilər. İkiqat zəncirli DNT-nin rayonları ayrılarkən işığın bu rayonlar tərəfindən udulması təxminən iki dəfə artır. İkiqat zəncirli DNT nümunəsində əsasların yarısının denaturasiyası zamanı temperatur T_m kimi qeyd olunur (DNT-nin ərimə temperaturu). Bir zəncirli DNT tərəfindən işığın udulması temperaturun artması zamanı çox az dəyişilir. (b) T_m qiyməti DNT-nin G-C tərkibinin funksiyasıdır, G-C tərkibin faiz miqdarı çox olduqca T_m qiyməti də yüksək olur.

DNT zəncirlərinin ayrıldığı *ərimə temperaturu* (***T*****m**) bir sıra faktorlardan asılıdır. Daha çox G•C əsas cütlərinə malik olan DNT molekulları denaturasiya üçün daha yüksək temperaturun olmasını tələb edir, çünki G•C cütlərində olan üç hidrogen rabitəsi yalnız iki hidrogen rabitəsinə malik olan A•T cütlərə nisbətən DNT-yə daha çox stabillik verir. Həqiqətən də, verilmiş DNT nümunəsində G•C əsas cütlərinin faiz miqdarı onların ***T*****m** qiymətinə görə hesablana bilər (Şəkil 5-7b). İon qatılığ da ***T*****m** qiymətinə təsir edir, çünki zəncirdə mənfi yüklənmiş fosfat qrupları müsbət yüklənmiş ionlarla əhatə ("mühafizə") olunur. Ion qatılığı aşağı olanda bu "mühafizə" azalır, beləliklə də zəncirlər arasında bir-birindən itələmə qüvvəsi artır və uyğun olaraq ***T*****m** qiyməti aşağı düşür. Hidrogen rabitələrinin stabilliyini pozan formamid və sidik cövhəri kimi agentlər də ***T*****m** qiymətini aşağı salır. Son anda kəskin pH da aşağı temperaturda DNT denaturasiyasına səbəb olur. Aşağı (turş) pH mühitində əsaslar protonlaşırlar və beləliklə müsbət yüklənərək bir-birini dəf edirlər. Yuxarı (qələvi) pH mühitində əsaslar protonu itirirlər və mənfi yüklənmiş olurlar, nəticədə hər ikisi eyni yükə malik olduğundan yenə də bir-birini dəf edirlər. Hüceyrə daxilində sabit vəziyyətin saxlanılması üçün temperatur və pH əsas mühitdir. DNT-nin ayrılması üçün kritik olan bu xüsusiyyətlər laboratoriya şəraitində DNT üzərində manipulyasiyaların aparılması üçün çox əhəmiyyətlidir.

Denaturasiya nəticəsində əmələ gələn bir zəncirli DNT molekulları nizamlanmamış quruluşa malik olan nizamsız spiralı əmələ gətirir. Tempraturun aşağı salınması, ion qatılığının artırılması və ya pH-ın neytrallaşdırılması iki komplementar zəncirin yenidən assosasiyasına səbəb olaraq tam, mükəmməl ikiqat zənciri əmələ gətirir. Bu cürə ***renaturasiya*** dərəcəsi zamandan, DNT-nin qatılığından və ion qatılığından asılıdır. Nukleotid ardıcıllığına görə yaxın (komplementar) olmayan iki DNT zənciri yenə də nizamsız spiral şəkilində qalacaq və renaturasiya etməyəcək, amma onlar hər bir zəncirin öz komplementarını axtarıb tapmaqğı və onunla komplementar tam mükəmməl ikiqat spiral əmələ gətirməni ingibirləşdirməyəcək. DNT-nin denaturasiyası və renaturasiyası nuklein turşularının hibridləşməsinin əsasıdır ki, bu iki DNT nümunəsi arasında qarşılıqlı əlaqəni öyrənmək üçün və çoxsaylı müxtəlif DNT ardıcıllıqlarına malik olan qatışıqda spesifik DNT molekulunu müəyyən etmək və ayırmaq üçün istifadə olunan mükəmməl metoddur (bax Fəsil 6).

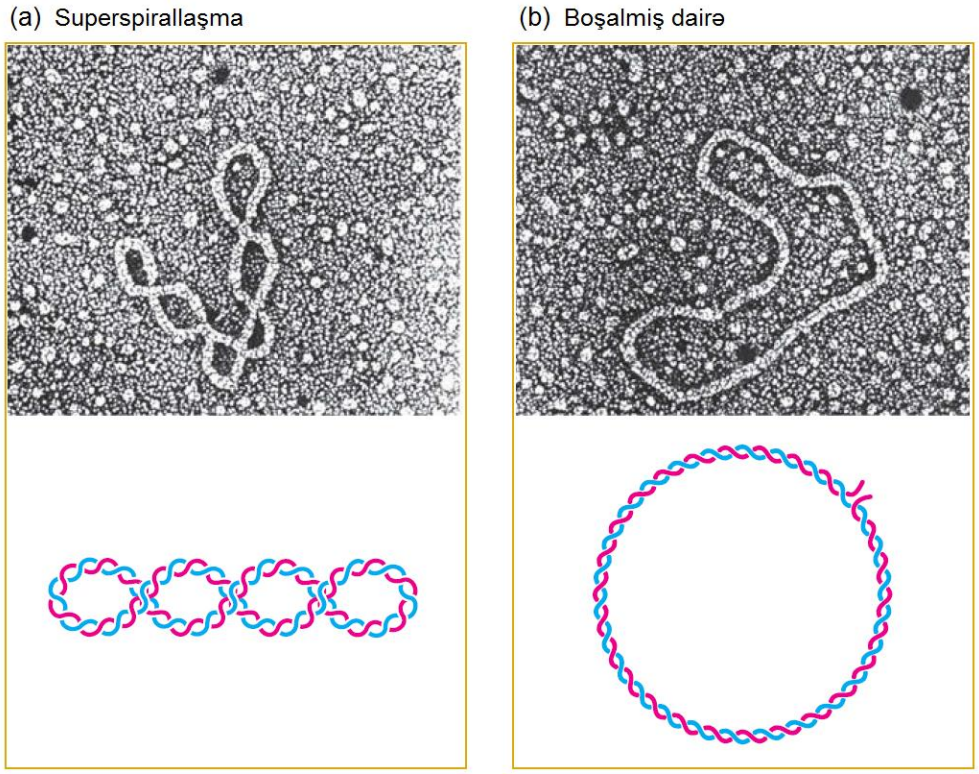
DNT-də Torsional Stress Fermentlər Vasitəsilə Buraxılır

Çox bakterial genom DNT-si və çox virus DNT-ləri həlqəvi molekul quruluşuna malikdirlər. Həlqəvi DNT molekulları demək olar bütün eukariot hüceyrələrin malik olduğu mitoxondridə, və bütün bitkilərin və bəzi birhüceyrəli eukariotların malik olduğu xloroplastda da mövcuddur. Həlqəvi DNT molekulunda iki zəncirin hər biri sərbəst sonluğu olmayan qapalı quruluş əmələ gətirirlər. Baxmayaraq ki, eukariotik nüvə DNTsi xəttidir, DNT-nin uzun ilgəkləri xromosom daxilində müəyyən bir sahədə bərkidilmişdir (bax Fəsil 8). DNT replikasiyası zamanı həlqəvi DNT molekulunun və eukariot xromosomun müəyyən bir ilgəyinin ikiqat spiralının hər bir zənciri sərbəst sonluğu olmayan qapalı quruluşu yaradır, ona görə də "tarsioanl stresə" məruz qalır.

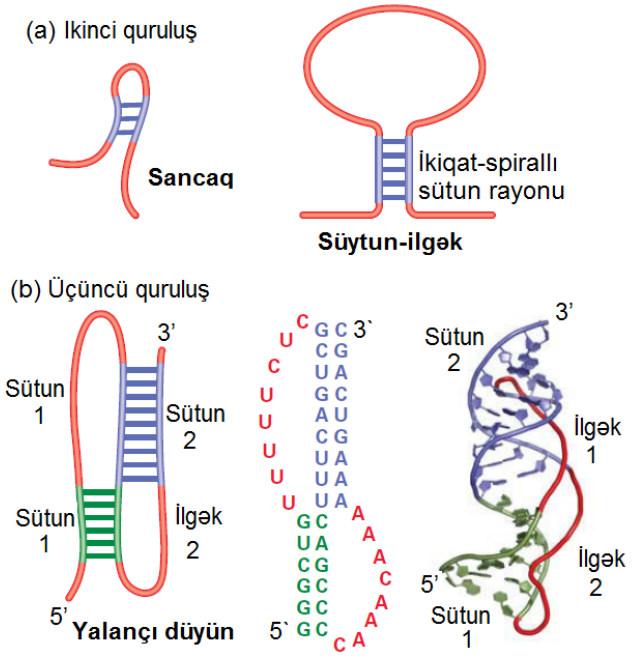
Əksər bakterial DNT xromosomlarda və viruslardan ayrılmış həlqəvi ikiqat DNT zəncirlərinə malik olan DNT-lər güclü burulmuş şəkildə olurlar, yəni onlar eyni uzunluqda B-formalı xətti DNT-dən çox az spiral dönmələrə malikdirlər. Nəticədə DNT molekulu burulmuş rezin lent kimi özü-özünə geriyə burulur *superspiral* əmələ gətirir (Şəkil 5-8a). DNT replikasiyası və ya transkripsiyası zamanı baş verən DNT molekulunun spiral burulmasının lokal açılması və ya həddən artıq burulması molekulun qalan hissəsində tarsional stresi induksiya edir, çünki molekulun ucları fırlanmaq üçün sərbəst deyildir. Başqa sözlə, DNT spiralının bir hissəsi burulmuş vəziyyətdə olanda, sola burulmuuş superspiral, Şəkil 5-8-də olduğu kimi, həlqəvi DNT molekuluna çevrilir. Amma bütün heceyrələr ***topoizomeraza I*** fermentinə malikdir və bu ferment replikasiya və ya başqa hüceyrə prosesləri zamanı DNT molekulunda yaranan istənilən torsional stresi aradan götürür. Bu ferment istənilən saytda DNT-yə birləşir və zəncirlərin birində fosfodiefir əlaqəsini qırır. DNT-də bu cürə bir zəncirli qırılma "***nick***" adlanır. Qırılmış sonluq sonra qirilmamış zəncir ətrafında fırlanır və superspirallaşmanın itirilməsinə səbəb olur (Şəkil 5-8b). Sonda isə eyni ferment (burada topoizomeraza I) qırılmış ucların birləşməsini həyata keçirir (liqasiya edir). Fermentin başqa bir tipi, ***topoizomeraza II***, ikiqat zəncirli DNT spiralındə hər iki zənciri qırır və sonda onları yenidən birləşdirir. Nəticədə, topoisomerase II həm torsional stressi azad edə bilər, həm də iki həlqəvi DNT molekulunu iki zəncirli spiral kimi birləşdirə bilir.

Müxtəlif Tipli RNT-lər Öz Funksiyalarına Uyğun Olaraq Fərqli Konformasiyaları Yaradırlar

RNT-nin ilkin quruluşu iki hal istisna olmaqla əsasən DNT-nin quruluşuna oxşardır, bunlar: RNT molekulunda şəkər qalığı ribozadır və 2′ karbona hidroksil qrupu birləşir (bax Şəkil 2-16b), DNT molekulundakı timin RNT də urasil ilə əvəz olunur. DNT-də urasilin əvəzinə timinin olması, DNT-nin reparasiyasında onun funksional olması baxımından DNT-nin uzun müddətli stabilliyi üçün çox əhəmiyyətlidi (bax Bölmə 5.6). Əvvəldə qeyd olunduğu kimi, ribozanın 2′-C atomunda olan hidroksil qrupu RNT-ni DNT ilə müqayisədə kimyəvi cəhətdən daha dəyişkən (labil) edir. Bu dəyişkənliyin nəticəsində RNT qələvi məhlulun təsiri ilə kəsilərək mononukleotidlərə ayrılır (bax Şəkil 5-6) amma DNT yox. RNT-nin 2′-C atomunda olan hidroksil qrupu həmçinin RNT ilə həyata keçirilən kataliz prosesində iştirak edən kimyəvi cəhətdən reaktiv qrupu təmin edir. DNT kimi RNT-də uzun polinukleotiddir, ikiqat zəncirli və ya bir zəncirli ola bilir, xəttidir və ya dairəvidir. O, həmçinin RNT zəncirində və bir DNT zəncirindən təşkil olunmuş hibrid spiralı əmələ gətirə bilir. Yuxarıda qeyd olunduğu kimi, RNT-RNT və RNT-DNT ikiqat spiral DNT-nin A forması kimi yığcam (kompakt) konformasiyaya malik olur (bax Şəkil 5-4b).



EKSPERIMENTAL ŞƏKIL 5-8
Topoizomeraza I DNT-də torsional stresin qarşısını alır. (a) SV40 virus DNT-sinin elektron mikroskopunda şəkili. SV40 virus DNT-si ayrılıb onlarla assosasiyada olan zülallardan qoparılarkən ikiqat DNT zənciri (DNT dupleksi) burularaq super-spiral quruluş əmələ gətirir. (b) Əgər superspiral DNT molekulunda "nick" əmlə gələrsə (spirallardan biri qırılarsa) zəncirlər açılır və super spiral quruluş itirilir. Topoizomeraza I bu reaksiyanı kataliz edir və qırılmış ucları yenidən birləşdirir. Ayrılmış SV40 virus DNT-sində bütün super spirallaşma bu fermentin ardıcıl təsiri ilə aradan qaldırıla bilir və zəifləmiş həlqəvi konformasiya alınar. Aydınlıq üçün, aşağıda molekulların forması sadələşdirilmiş şəkildə verilmisdir.



Əsasən çox uzun ikiqat zəncirli spiral şəklində mövcud olan DNT-dən fərqli olaraq hüceyrənin əksər RNT molekulları bir zəncirlidir və müxtəlif konformasiyaları yaradırlar (Şəkil 5-9). Müxtəlif tipli RNT-lərin ölçülərində və konformasiyalarında olan müxtəliflik (fərqlər) onlara imkan verir ki, hüceyrədə xüsusi funksiyaları yerinə yetirsinlər. Bir zəncirli RNT-lərin yaratdığı ən sadə ikinci quruluş komplementar əsasların cütləşməsi nəticəsində əmələ gəlir. "Sancaq" təxminən beşdən ona qədər nukleotid daxilində əsasların bir-biri ilə cütləşməsi nəticəsində əmələ gəlir, "sütun ilgəklər" isə on birdən bir neçə yüzə qədər nukleotid daxilində əsasların cütləşməsi nəticəsində yaranır. Bu sadə bükülmələr mürəkkəb üçüncü quruluşun əmələ gəlməsində birgə iştirak edirlər, bunlardan biri "yalançı düyün" (pseudoknot) adlanır.

ŞƏKİL 5-9 RNT-nin ikinci və üçüncü qutuluşu. (a) Sütun-ilgəklər, sancaqlar və başqa ikinci quruluş formaları RNT molekulunda uzaq komplementar seqmentlər arasında əsasların cütləşməsi nəticəsində əmələ gəlir. Süstun-ilgəklərdə bir zəncirli ilgək cütləşmiş-əsasların spiralı arasında sütun yüzlərlə, hətta minlərlə nukleotid uzunluqda ola bilər, sancaqlarda isə qısa dönmələr çox az nukleotid uzunluqda, hətta dörd nukleotiddən ibarət ola bilir. (b) RNT-nin üçüncü quruluşunun bir tipi yalançı-düyünlər (Pseudoknots), komplementar əsaslar arasında cütləşmə yolu ilə əmələ gələn ikinci quruluş ilgəklərinin qarşılıqlı əlaqələri nəticəsində formalaşmışdır. Göstərilmiş quruluşda insanın telomeraza RNT-sinin mərkəzi (özək) domeni verilmişdir. *Solda*: ikinci-quruluş diaqramı əsasları cütləşən nukleotidlər yaşıl və mavi rənglərdə, bir-zəncirli rayonlar isə qırmızı rənglə verilir. *Ortada*: Telomeraza RNT-sinin mərkəzi domeninin nukleotid ardıcıllığı soldakı ikinci quruluş diaqramına uyğun rənglənmişdir. *Sağda*: Telomeraza mərkəzi domenin quruluş diaqramı 2D-NMR ilə təyin edilmişdir, əsaslardan yalnız cütləşmiş-əsaslar və tyub şəkilində şəkər-fosfor özülü soldakı diaqramlara uyğun rənglənmiş şəkildə göstərilmişdir. [(b) hissəsində *orta* və *sağ* C.A. Theimer et al., 2005, *Mol.Cell,* **17**:671. PDB ID lymo.]

Aşağıda ətraflı müzakirə olunduğu kimi, tRNT molekulları zülal sintezi üçün həlledici əhəmiyyətə malik olan mühitdə yaxşı müəyyən edilmiş üç-ölçülü arxitekturanı (quruluşu) alır. Daha böyük olan rRNT molekulları da həmçinin aralarında dəyişkən linkerlər olan yaxşı müəyyən olunmuş üç-ölçülü quruluşa malikdir. İkinci və üçüncü quruluşlar həmçinin mRNT

molekulunda da tapılmışdır, xüsusən də molekulun uclarına yaxın rayonlarda. Aydındır ki, daha sonra RNT molekulları zülallarda olduğu kimi, daha az quruluşa salınmış dəyişkən hissələrlə birləşmiş tam quruluşda olan domenlər şəkilində zonaları əmələ gətirirlər.

RNT molekulunun bükülmüş domenləri, zülallarda tapılmış α spiral və β zəncir ilə yalnız quruluşuna grə analoji deyillər, həmçinin bir çox hallarda katalitik qabliyyətə də malikdirlər. Bu cürə katalitik RNT-lər **ribozimlər** adlanır. Baxmayaraq ki, bir qayda olaraq ribozimlər ribozim quruluşunu stabilləşdirən zülallarla assosasiyada olurlar, amma katalizi aparan RNT-dir. Bəzi ribozimlar splaysinqi kataliz edir, yaxşı məlum olan bu proses zamanı daxili RNT ardıcıllığı kəsilərək atılır və qalan iki zəncir yenidən liqasiya olunur. Bu proses çoxhüceyrəli eukariotlarda funksional mRNT molekulunun çoxunun formalaşması zamanı, həmçinin bir hüceyrəli eukariotlarda, o cümlədən maya göbələyində, bakteriyalarda və arxeyalarda baş verir. Qəribədir ki, bəzi RNT-lər ***öz-özünü - splaysinq*** etməyə malikdirlər və onlarda katalitik fəallıq kəsilib atılmalı olan ardıcıllıqda yerləşir. Splaysinqin və öz-özünü-splaysinqin mexanizmi Fəsil 10-da ətraflı müzakirə olunur. Bu fəsildə sonra qeyd olunduğu kimi, rRNT zülal sintezi zamanı (translyasiya prosesində) peptid əlaqələrin formalaşmasında katalitik rol oynayır.

Bu fəsildə biz diqqətimizi mRNT, tRNT və rRNT molekullarının funksiyalarına yönəldəcəyik. Sonrakı fəsillərdə isə, çox hallarda zülallarla assosasiya edib digər hüceyrə funksiyalarında iştirak edən başqa RNT-lərlə rastlaşacağıq.

5.1 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Nuklein Turşularının Quruluşu

- Dezoksiribonuklein turşusu (DNT), genetik material olub, zülalların amin turşusu ardıcıllığı barədə informasiyanı daşıyır. O bir neçə tip ribonuklein turşusuna (RNT), o cümlədən məlumat RNT (mRNT), nəqliyyat RNT (tRNT) və ribosomal RNT-yə (rRNT) transkripsiya olunur, bunların hamısı zülalların sintezində iştirak edirlər (bax Şəkil 5-1).
- Bütün DNT-lər və əksər RNT-lər nukleotidlərin uzun, şaxələnməmiş polimerləridirlər. Nukleotidlər fosforlaşmış pentozanın purin və ya pirimidin tərkibli üzvi əsaslarla birləşməsindən əmələ gəlmişdir.
- Purinlər adenin (A) və quanin (G), pirimidin sitozin (C) həm DNT həm də RNT-nin tərkibində vardır. Pirimidin timin (T) DNT-də olur və RNT-də onu pirimidin urasil (U) əvəz edir.
- Polinukleotiddə bir-birinə yaxın olan bitişik nukleotidlər bir-biri ilə fosfodiefir əlaqələri ilə birləşmişlər. Bütöv zəncir 5′ və 3′ sonluqlarla kimyəvi istiqamətlənməyə malikdir (bax Şəkil 5-2).
- Təbii DNT (B DNT) iki anti parallel yerləşmiş komplementar, bir-birinə burulmuş sağa burulan, əsasları daxildə və iki şəkər fosfor özülü xarici tərəfdə olan ikiqat spiralı əmələ gətirən, polinukleotid zəncirələrə malikdir (bax Şəkil 5-3). Zəncirlər arasında əsasların cütləşməsi və yaxın (bitişik) əsas cütlər arasında spiral oxuna perpendikulyar olan hidrofob qarşılıqlı əlaqələr bu neqativ quruluşu stabilləşdirir.
- Nuklein turşularında olan əsaslar hidrogen rabitələri ilə qarşılıqlı əlaqədə olurlar. Standart Uotson-Krik əsas cütləri G•C, A•T (DNT molekulunda) və G•C, A•U (RNT molekulunda) cütləridirlər. Əsas cütlərinin əmələ gəlməsi DNT və RNT-nin üç-ölçülü təbii (nativ) quruluşunu stabilləşdirir.
- Zülalın DNT-yə birləşməsi lokal əyilməyə səbəb olmaqla və ya DNT molekulunun burulmuş quruluşunu açmaqla onun spiral quruluşunu deformasiya edə bilər.
- İstilik (qızdırmaq) DNT zəncirlərini bir-birindən ayırır (denaturasiya edir). G•C əsas cütlərinin faiz miqdarı artdıqca DNT-nin ərimə temperaturu (T_m) artır. Müvafiq normal şərait yarandıqda ayrılmış komplementar nuklein turşusu renaturasiya edir.
- Həlqəvi DNT molekulları öz-özünə burula bilir və super-spiralı əmələ gətirirlər (bax Şəkil 5-8). Topoizomeraza adlandırılan fermentlər torsional stresi buraxır və super spiral quruluşu həlqəvi DNT molekulundan uzaqlaşdırır. Uzun xətti DNT də həmçinin torsional stresə məruz qala bilir, çünki uzun ilgəklər xromosom daxilində müəyyən nahiyələrdə yerləşirlər.
- Hüceyrə RNT-ləri tək zəncirli polinukleotidlərdir, onlardan bəziləri yaxşı müəyyən olunmuş ikinci və üçüncü quruluşları əmələ gətirirlər (bax Şəkil 5-9). Ribozimlər adlandırılan bəzi RNT-lər isə katalitik fəallığa malikdirlər.

5.2 Zülal Kodlaşdıran Genlərin Transkripsiyası və Funksional mRMT-nin Yaranması

Genin sadə təyini "sadə polipeptid zəncirinin sintezini müəyyən edən və ya funksional RNT (məsələn tRNT) haqqında informasiyanı daşıyan DNT vahidi"dir. Kiçik virusların DNT molekulları yalnız bir neçə genə malikdir, amma ali bitkilərdə və heyvanlarda hər bir xromosomda olan bir DNT molekulu bir neçə min genə malik ola bilir. Genlərin əsas çoxluğu zülal molekullarının quruluşu haqqında informasiya daşıyır və *zülal kodlaşdıran genlərin* RNT kopiyası hüceyrənin mRNT molekullarıdır.

RNT sintezi zamanı A, G, C və T-nin təşkil etdiyi dörd əsaslı DNT dili sadəcə olaraq U ilə əvəz olunan T istisna olmaqla identik əsaslardan təşkil olunmuş dörd əsaslı RNT dilinə köçürülür və ya ***transkripsiya*** olunur. Bunu əksinə, zülalın sintezi zamanı DNT və RNT-nin dörd əsaslı dili zülalların 20 amin turşusundan ibarət olan dilinə ***tərcümə - translyasiya*** olunur. Bu bölmədə biz diqqətimizi zülal kodlaşdıran genlərdən funksional mRNT-lərin formalaşmasına yönəldəcəyik (bax Şəkil 5-1, pillə 1). Buna bənzər proses rRNT və tRNT seləflərini rRNT və tRNT kodlaşdıran genlərindən yaradır (istehsal edir); bu seləflər, sonra modifikasiya olunaraq funksional rRNT və tRNT-ləri əmələ gətirirlər (bax Fəsil 9 və 10). Buna bənzər olaraq, spesifik hədəf mRNT-lərin translyasiyasını və stabilliyini tənzimləyən minlərlə mikro RNT-lər (miRNT) RNT polimerazalar vasitəsilə seləf miRNT-lərə transkripsiya olunurlar, onlardan da prosessinq nəticəsində funksional miRNT-ləri əmələ gəlirlər (Fəsil 9). Digər ***zülal-kodlaşdırmayan*** (sadəcə olaraq "***kodlaşdırmayan***") RNT-lər

xüsusi zülal-kodlaşdıran genlərin transkripsiyasının tənzimlənməsinə kömək edirlər. Transkripsiyanın tənzimlənməsi imkan verir ki, fərqli gen dəstləri çoxhüceyrəli orqanizmləri əmələ gətirən çoxsaylı müxtəlif tipli hüceyrələrdə ekspressiya olunsunlar. O həmçinin imkan verir ki, müxtəlif genlərdən müxtəlif miqdarda mRNT-lər transkripsiya olunsunlar, bunun da nəticəsində hüceyrədə kodlaşdırılmış müxtəlif zülalların miqdarında fərqlər əmələ gəlir. Transkripsiyanın tənzimlənməsi Fəsil 9-də verilmişdir.

Templeyt DNT Zəncir RNT Polimeraza Vasitəsi ilə Komplementar RNT Zəncirinə Transkripsiya Olunur

DNT-nin transkripsiyası zamanı DNT zəncirlərinin biri ***templeyt*** rolunu oynayaraq ribonukleozid trifosfat (rNTP) monomerlərin polimerləşərək komplementar RNT zəncirini əmələ gətirməsi üçün ardıcıllığı təyin edir. Templeyt DNT zəncirində olan əsaslar yeni gələn komplementar rNTP-lərlə əsas-cütləri əmələ gətirirlər və sonra **RNT polimeraza** ilə kataliz olunan **polimerləşmə reaksiyasına** girərlər. Polimerləşmə zamanı uzunamaqda olan RNT zəncirinin 3’ oksigeni ilə yeni əlavə olunan sələf ribo-nukleotidin α-fosfatı arasında nukleofill reaksiya baş verir (burada 3’ oksigen α-fosfata "həmlə" edir), nəticədə onlar arasında fosfodiefir əlaqəsi yaranır və pirofosfat (PP_i) ayrılır. Bu mexanizmin gedişinə uyğun olaraq RNT molekulunun sintezi həmişə 5’→3’ istiqamətdə gedir (Şəkil 5-10a).

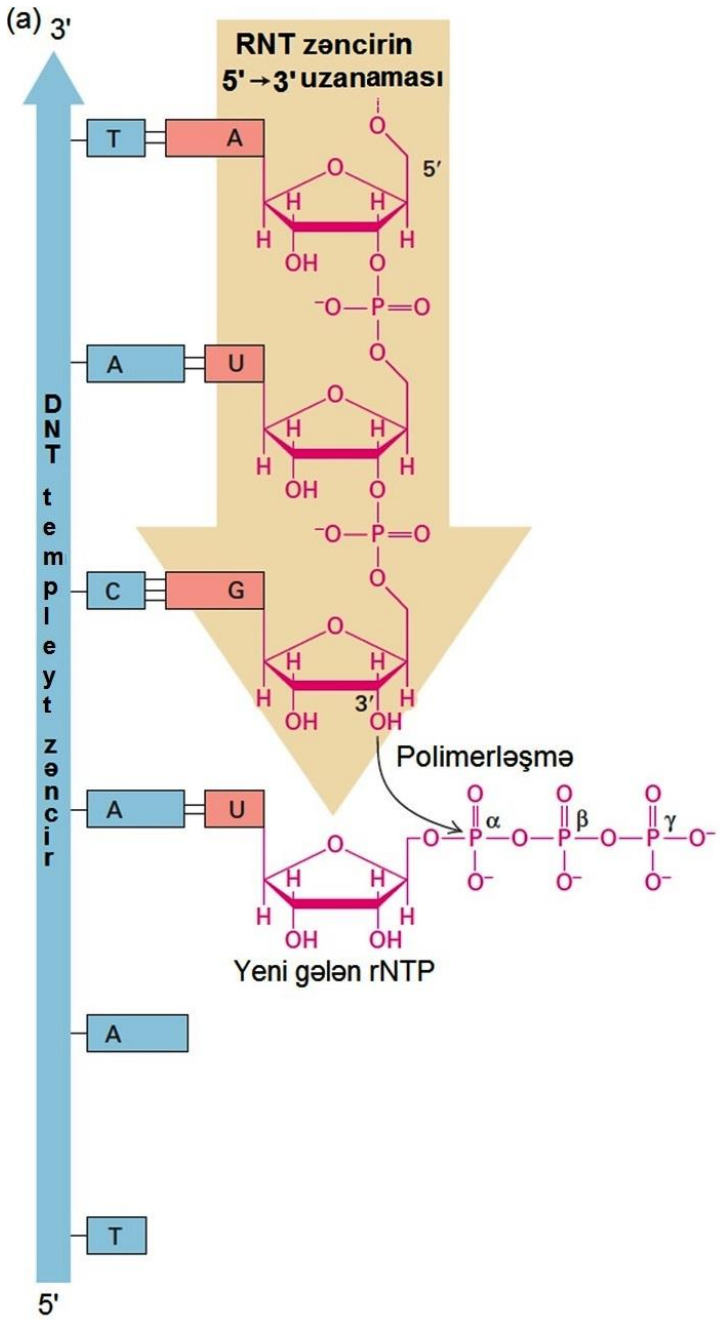
Polimerləşmə reaksiyasının energetikası ribonukleotidlərin uzunamaqda olan RNT zəncirinə əlavə olunmasına böyük üstünlük verir, çünki ribonukleotid trifosfat monomerlərin α və β fosfor qalıqları arasındakı yüksək enerjili rabitə sintez olunan zəncirdə nukleotidlər arasındakı aşağı enerjili fosfodiefir rabitə ilə əvəz olunur. Reaksiyanın tarazlığı mononukleotidlərdən ayrılmış PP_i qruplarının kəsilərək iki molekul qeyri üzvi fosfora çevrilməsini kataliz edən pirofosfataza fermenti tərəfindən zəncirin uzunaması istiqamətində idarə olunur. DNT-də ikiqat zəncirdə olduğu kimi, DNT templeyt zəncir və onunla əsas cütləri əmələ gətirən uzunamaqda olan RNT zəncirləri bir-birinin əksi istiqamətdə 5’→3’ istiqamətində uzanır.

Qəbul olunmuş konvensiyaya görə RNT polimerazanın DNT üzərində transkripsiyanı başladığı sayt +1 kimi nömrələnir (Şəkil 5-10b). *Aşağıya doğru gediş* (*downstream*) templeyt DNT zənciri üzərində transkripsiyanın getdiyi istiqaməti bildirir; *yuxarıya doğru gediş* (*upstream*) isə əks istiqaməti bildirir. Start saytından aşağıya doğru gediş DNT ardıcıllığında nukleotidlərin sıra vəziyyəti müsbət (+) işarlənir, yuxarı doğru gediş istiqamətdə isə mənfi (–) işarələnir. RNT 5’→3’ istiqamətində sintez olunduğundan, RNT polimeraza templeyt üzərində aşağıya doğru 3’→5’ istiqamətdə hərəkət edir. Yeni sintez olunan RNT DNT templeyt zəncirinə komplementar olur, ona görə də o timini urasil ilə əvəz etməklə templeyt olmayan zəncirlə identik olur.

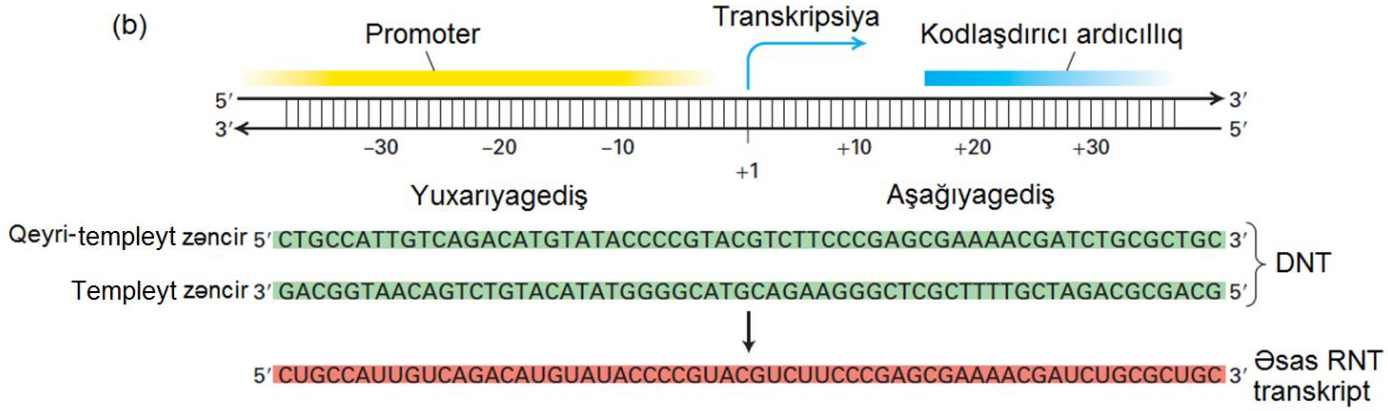
Transkripsiyanın Mərhələləri. Transkripsiyanı aparmaq üçün RNT polimeraza fermenti Şəkil 5-11-də göstərildiyi kimi, bir neçə fərqli funksiyanı yerinə yetirir. Transkripsiyanın *inisiasiyası* zamanı, RNT polimeraza inisiasiya faktorlarının (irəlidə müzakirə olunacaq) köməyi ilə ikiqat DNT spiralında **promotor** adlanan xüsusi saytı tanıyır və ona birləşir (pillə 1). Birləşdikdən sonra, RNT polimeraza və inisiasiya faktorları templeyt zəncirdə olan əsasların polimerləşmək üçün hazır olan yeni rbonukleozid trifosfat əsaslarla cütləşməsini mümkün etmək üçün DNT zəncirlərini ayırırlar. RNT polimeraza və inisiasiya faktorları, sonra templeyt DNT-də promotor zonasında yerləşən transkripsiyanın start saytı ətrafında DNT-ni 12-14 əsas-cütü uzunluqda ayıraraq (pillə 2) templeyt zəncirin fermentin fəal mərkəzinə daxil olmasına imkan yaradırlar. Bu *fəal mərkəz,* templeyt zəncirə komplementar olan ribonukleotid trifosfatlar (rNTP) arasında fosfodiefir əlaqələrin yaranmasının kataliz edildiyi saytdır. Polimerazada DNT-nin ərimiş 12-14 əsas cütlü rayonu ***transkripsiya köpüyü*** adlanır. RNT zəncirinin ilk iki ribonukleotidi fosfodiefir əlaqələri ilə birləşdikdən sonra transkripsiyanın inisiasiyası tamamlanmış hesab olunur (pillə 3).

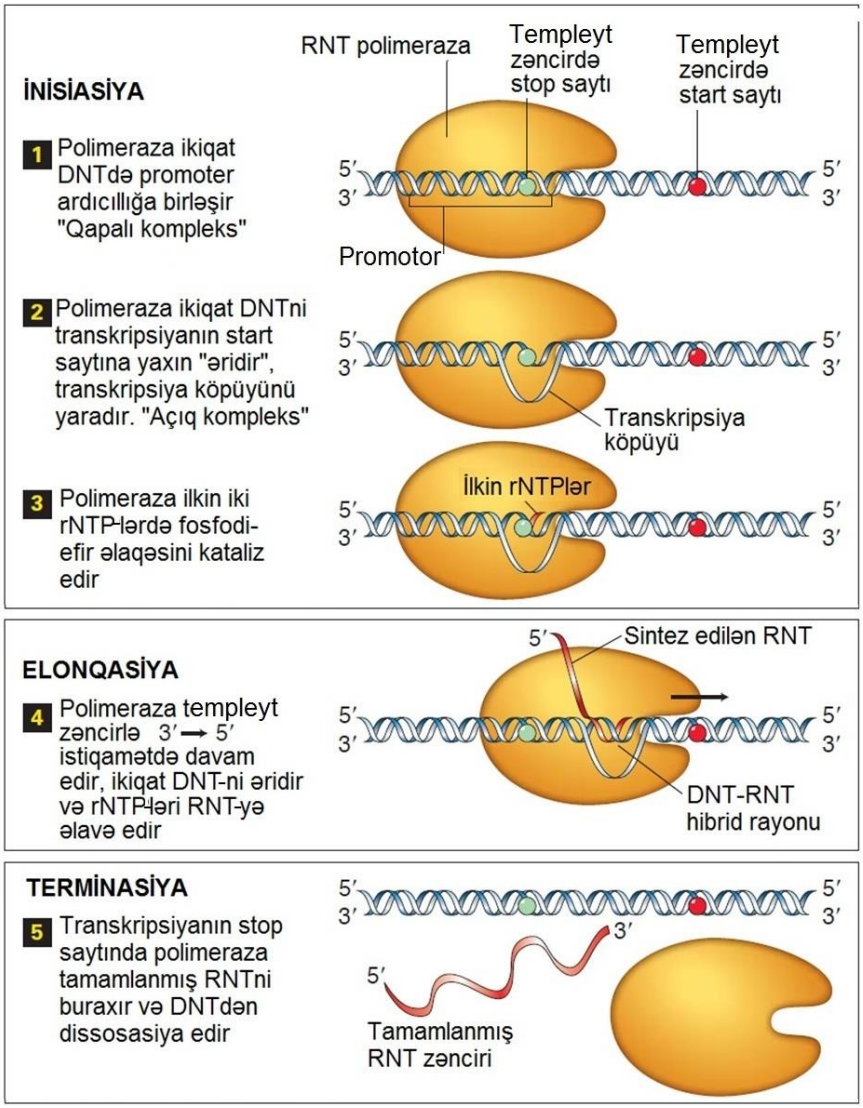
Bir neçə ribonukleotid polimerləşdikdən sonra RNT polimeraza promotor DNT-dən və inisiasiya faktorundan (bakteriyalarda σ-faktorlar, arxea və eukariotlarda ümumi transkripsiya faktorlarından) dissisasiya edir. ***Zəncirin elonqasiyası*** mərhələsində RNT polimeraza əsasları bir-bir keçərək templeyt DNT boyunca hərəkət edir, getdiyi istiqamətdə öndə ikiqat zəncirli DNT-ni açar və özündən sonra ***yuxarıyagediş*** istiqamətdə onların bir yerə gəlməsini təmin edir və zəncirlər transkripsiya köpüyünün *yuxarıyagediş* sonluğunda yenidən hibridləşirlər (Şəkil 5-11. pillə 4). Polimeraza ilə zəncirin elonqasiyası zamanı hər pilləda uzunamaqda olan RNT zəncirinin 3′ sonluğuna bir ribonukleotid əlavə olunur. Ferment, DNT-nin ərimiş rayonunu təxminən 14-20 əsas cütü uzunluqda transkripsiya köpüyündə saxlayır. Uzunamaqda olan RNT zəncirinin 3′ sonluğunda təqribən səkkiz nukleotid transkripsiya köpüyü daxilində templeyt DNT zənciri ilə əsas cütü əmələ gətirmiş vəziyyətdə olur. RNT polimeraza, templeyt DNT və yeni sintez olunmuş RNT zəncirindən ibarət olan *Elonqasiya kompleksi* son dərəcə yüksək stabilliyə malikdir. Məsələn, RNT polimeraza məməlilədə məlum olan, təxminən 2 million əsas cütündən ibarət olan ən uzun geni templeyt DNT-dən dissosasiya etmədən və ya yeni sintez olunmuş RNT zəncirini buraxmadan transkripsiya edir. RNT-nin sintezi 37°C temperaturda 1000-2000 nukleotid/dəqiqə sürəti ilə gedir, beləliklə elonqasiya kompleksi 24 saat müddətində fasiləsiz olaraq belə çox uzun gendən səlәf-mRNT-nin (pre-mRNT) sintezini təmin edir.

RNT sintezinin son mərhələsində, transkripsiyanın ***terminasiyası*** zamanı, tamamlanmış RNT molekulu RNT polimerazadan azad olur və polimeraza templeyt DNT-dən dissosasiya edir (Şəkil 5-11, pillə 5). RNT polimeraza azad olduqdan sonra, o həmin genin yenidən transkripsiyasına və ya başqa genin transkripsiyasına başlaya bilir.



ŞƏKIL 5-10 RNT 5′→3′ istiqamətində sintez olunuir. (a) Transkripsiya zamanı ribonukleotidlərin RNT polimeraza vasitəsi ilə polimerləşməsi. Uzunamaqda olan RNT zəncirinin 3′ sonluğuna əlavə olunan ribonukleotid templeyt DNT-də növbəti nukleotidlə yeni gələn ribonukleozid trifosfat (rNTF) arasında komplemnentarlıq prinsipinə uyğun olaraq əsas-cütü əmələ gətirməklə seçilir. RNT polimeraza böyüməkdə olan zəncirdə 3′ oksigeni və düzgün əsas cütü əmələ gətirən rNTF-in α-fosfat qrupu arasında reaksiyanı kataliz edərkən fosfodiefir əlaqəsi əmələ gəlir. RNT zənciri həmişə 5′→3′ istiqamətində sintez olunur və polyarlığına görə öz DNT templeytinin əksinə olur. (b) RNT transkripsiyasını təsvir edən konvensiya. *Yuxarıda*: RNT polimerazanın transkripsiyanı başladığı DNT nukleotidi +1 kimi göstərilmişdir. DNT üzərində polimerazanın hərəkət istiqaməti "***aşağıyagediş***" kim qeyd olunur və əsaslar müsbət nömrələrlə işarələnir. Əksinə istiqamət isə "***yuxarıyagediş***" kimi və əsaslar mənfi nömrələrlə işarələnir. Bir sıra əhəmiyyətli gen xüsusiyyətləri, o cümlədən RNT polimerazanın genin üzərində yerləşməsini təyin edən promotor ardıcıllığı, transkripsiyanın başlanma (start) saytından yuxarıyagediş hissədə yerləşir. (*Aşağıda*) Transkripsiya olunan DNT zənciri templeyt zəncirdir, onun komplementarı isə qeyri templeyt zəncirdir. Sintez olunan RNT zənciri templeyt zəncirə komplementardır, ona görə də qeyri templeyt zəncirin ardıcıllığı ilə identikdir, fərq yalnız timinin urasil ilə əvəz olunmasıdır.





ŞƏKİL 5-11 Transkripsiyanın üç mərhələsi. Transkripsiyanın inisiasiyası zamanı, RNT polimeraza transkripsiya köpüyünü əmələ gətirir və promotor zonasında yerləşən start saytından ribonukleotidlərin (rNTP) polimerləşməsini başlayır. DNT rayonları transkripsiya olunduqdan sonra ayrılmış zəncirlər yenidən ikiqat zəncirli spiralı əmələ gətirirlər. 3′ sonluğu istisna olmaqla yeni əmələ gəlmiş RNT zəncirinin yeri templeyt DNT zəncirində dəyişilir. RNT zəncirinin 5′ sonluğu fermentdə olan kanal vasitəsi ilə RNT polimerazadan çıxır. Polimeraza xüsusi terminasiya ardıcıllığına (stop sayta) rast gəldikdə transkripsiyanın terminasiyası baş verir. Detallarına görə tekstə bax. Sadəlik üçün, diaqramda təxminən ~40 nukleotid uzunluqda RNT kodlaşdıran DNT spiralının dörd burumunun transkripsiyası təsvir edilir. RNT-lərin çoxu kifayət qədər uzun olur və daha uzun DNT rayonunun transkripsiyasını tələb edir.

RNT polimerazanın quruluşu. Bakteriyaların, arxeaların və eukariot hüceyrələirin RNT polimerazaları quruluşlarına və funksiyalarına görə fundamental oxşardırlar. Bakterial RNT polimeraza iki, bir-birinə oxşar böyük subvahiddən (**β** və **β′** subvahidlər) və iki nüsxəyə malik olan (**α**) subvahidlərdən və bir nüsxə beşinci subvahiddən (**ω**) təşkil olunmuşdur, beşinci (ω) subvahid transkripsiya prosesi və ya hüceyrənin digər həyat fəaliyyəti üçün əhəmiyyət kəsb etmir, amma RNT polimerazaya stabillik verir və onun subvahidlərinin toplanmasında iştirak edir. Arxeaların və eukariot hüceyrələrin RNT polimerazaları, özək (core) kompleksə birləşən, əlavə bir neçə xırda subvahidlərə də malikdir, Fəsil 9-da onların şərhi verilmişdir. Transkripsiya prosesinin sxematik diaqramları, Şəkil 5-11-də olduğu kimi, əsasən RNT polimerazanın açılmış DNT molekuluna birləşmiş vəziyyətini göstərir. Amma rentgen-quruluş kristalloqrafiyası və baktereial RNT polimerazanın elonqasiya prosesində digər tədqiqatları göstərir ki, transkripsiya köpüyündə DNT əyilir (Şəkli 5-12).

Prokariot və Eukariot DNT-sində Genlərin Düzülüşü Fərqlənir

Transkripsiya prosesini təsvir etdikdən sonra biz qısa şəkildə DNT molekulunda informasiyanın geniş miqyaslı düzülüşünü təsvir edəcəyik və göstərəcəyik ki, bu düzülüş RNT sintezi üçün tələbləri necə diktə edir və nəticədə informasiyanın ötürülməsi düz və rəvan gedir. Son illərdə müxtəlif orqanizmlərdə bütöv genomun ardıcıllığının tam oxunması təkcə zülal-kodlaşdıran genlərin sayının geniş varaisiyasını deyil həmçinin bakteriyalarda və eukariot orqanizmlərdə onların təşkilindəki fərqləri də üzə çıxardı.

Bakteriyalarda bütün zülal-kodlaşdıran genlərin ümumi təşkili çox güclü və məntiqi bir çağırışa malikdir: birlikdə fəaliyyət göstərən zülalları kodlaşdıran genlər, məsələn triptofan aminturşusunun sintezi üçün tələb olunan fermentlər əksər hallarda DNT üzərində bir-biri ilə təmasda olan ardıcıllıqla düzülürlər. Genlərin bu cürə funksional qruplarda düzülüşü operon adlanır, çünki o vahid bir promotordan idarə olunur. Operonun transkripsiyası bir-biri ilə əlaqədar olan uyğun zülalların ardıcıllıqları barədə məlumatı daşıyan fasiləsiz RNT zəncirini istehsal edir (Şəkil 5-13a). mRNT-nin hər bir bölməsi bu seriyada olan müvafiq zülallardan birinin ardıcıllığına malik olan vahidi (və ya geni) təmsil edir. Bu cürə düzülüş operonda olan bütün genlərin *koordinasiya olunan şəkildə ekspressiyasına*

səbəb olur. Hər dəfə RNT polimeraza molekulu operonun promotorunda transkripsiyanı inisiasiya edəndə operonda olan bütün genlər (bütün zülalları kodlaşdıran ardıcılıqlar) transkripsiya və translyasiya olunurlar. Prokariot DNT-sində genlər arasında çox kiçik qeyri kodlaşdırıcı boş sahələr olmaqla bir-birinə çox yaxın yerləşmişlər və DNT birbaşa mRNTyə transkripsiya olunur. Prokariotlarda DNT eukariotlarda olduğu kimi, nüvə ilə ayrılmayıb və yeni sintez olunan mRNT-nin artıq sintez olunan hissəsi RNT-polimerazadan çıxan kimi ribosomların translyasiyasının start nöqtəsini birbaşa tutması üçün imkanı olur. Nəticədə, mRNT-nin translyasiyası hatta mRNT-nin 3′ sonluğunun sintezi RNT polimerazanin fəal saytında davam etdiyi müddətdə başlayır.

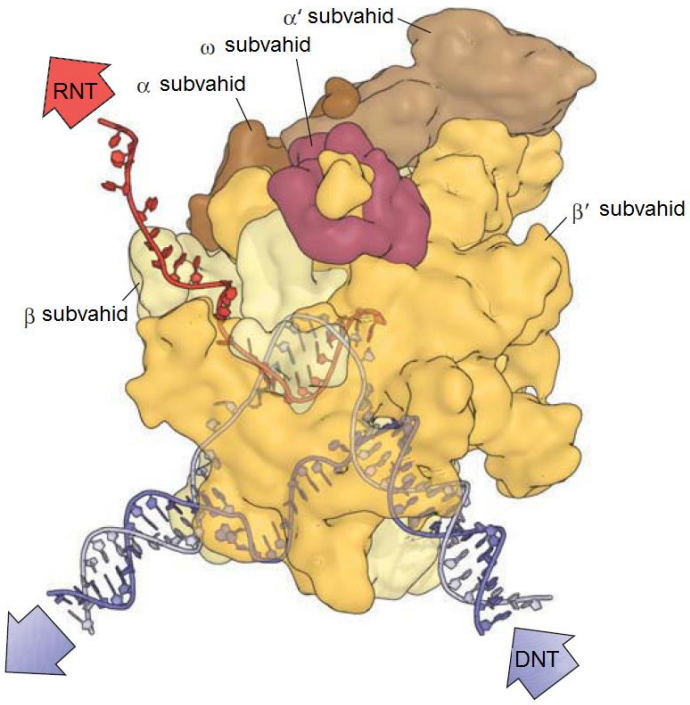
Genlərin belə ekonomik klaster düzülüşü eukariotlarda, hətta metobalik xüsusiyyətlərinə görə bakteriyalara yaxın olan ən sadə eukariot bir hüceyrəli maya göbələyində belə nadir rast gəlinən vahid metabolik funksiyaya səbəb olur. Əksinə, eukariotlarda birlikdə fəaliyyət göstərən zülalları kodlaşdıran genlər çox hallarda DNT-də fiziki olaraq bir-birindən ayrılmış şəkildə yerləşirlər, adətən belə genlər müxtəlif xromosomlarda yerləşirlər. Hər bir gen öz ayrıca promotorundan transkripsiya olunuraq bir mRNT-ni əmələ gətirir və bu mRNT translyasiya olunmaqla vahid bir polipeptidi əmələ gətirir (Şəkil 5-13b).

Eukariot genlərinin quruluşu barədə ilkin tədqiqatlar heyvanları yoluxduran virusların öyrənilməsi ilə başlandı. Tədqiqatçılar ilk dəfə virus mRNT-sini kodlaşdıran virus DNT rayonlarını analiz edəndə onlar, verilmiş tək bir mRNT ardıcıllığının DNT üzərində mRNT-də olmayan DNT ardıcıllıqları ilə bir-birindən ayrılmış bir neçə rayonunda kodlaşdırılıdığını müşahidə etməklə təccübləndilər. Sonralar gen klonlaşdırılmasının və DNT ardıcıllığının oxunmasının inkişaf etməsi (bax Fəsil 6) tədqiqatçıların çoxhüceyrəli orqanizmlərdə genom DNT ardıcıllıqlarını onların RNT ardıcıllıqları ilə müqayisə etməsinə imkan verdi. Tədqiqatçılar aşkar etdilər ki, hüceyrənin əksər mRNT-ləri də genom DNT-sinin ***intronlar*** adlanan DNT ardıcıllıqları ilə ayrılmış ***eqzonlar*** adlanan bir sıra ayrı rayonlarında kodlaşdırılır. Sonrakı tədqiqatlar göstərdilər ki, gen əvvəlcə çox uzun əsas transkriptə transkripsiya olunur, buna həm eqzon ardıcıllıqları həm də onları bir-birindən ayıran intron ardıcıllıqları daxil olur. Sonra intronlar uzaqlaşdırılır və eqzonlar bir yerə splays olunurlar (bax Fəsil 10). Baxmayaraq ki, intronların mövcudluğu çoxhüceyrəli eukariotların hamısı üçün ümumi haldır, amma onlar bakteriyalarda və arxealarda çox nadir hallarda rast gəlinir və bir hüceyrəli eukariotların çoxunda, məsələn maya göbələklərində onların mövcudluğu seyrək rast gəlinir.

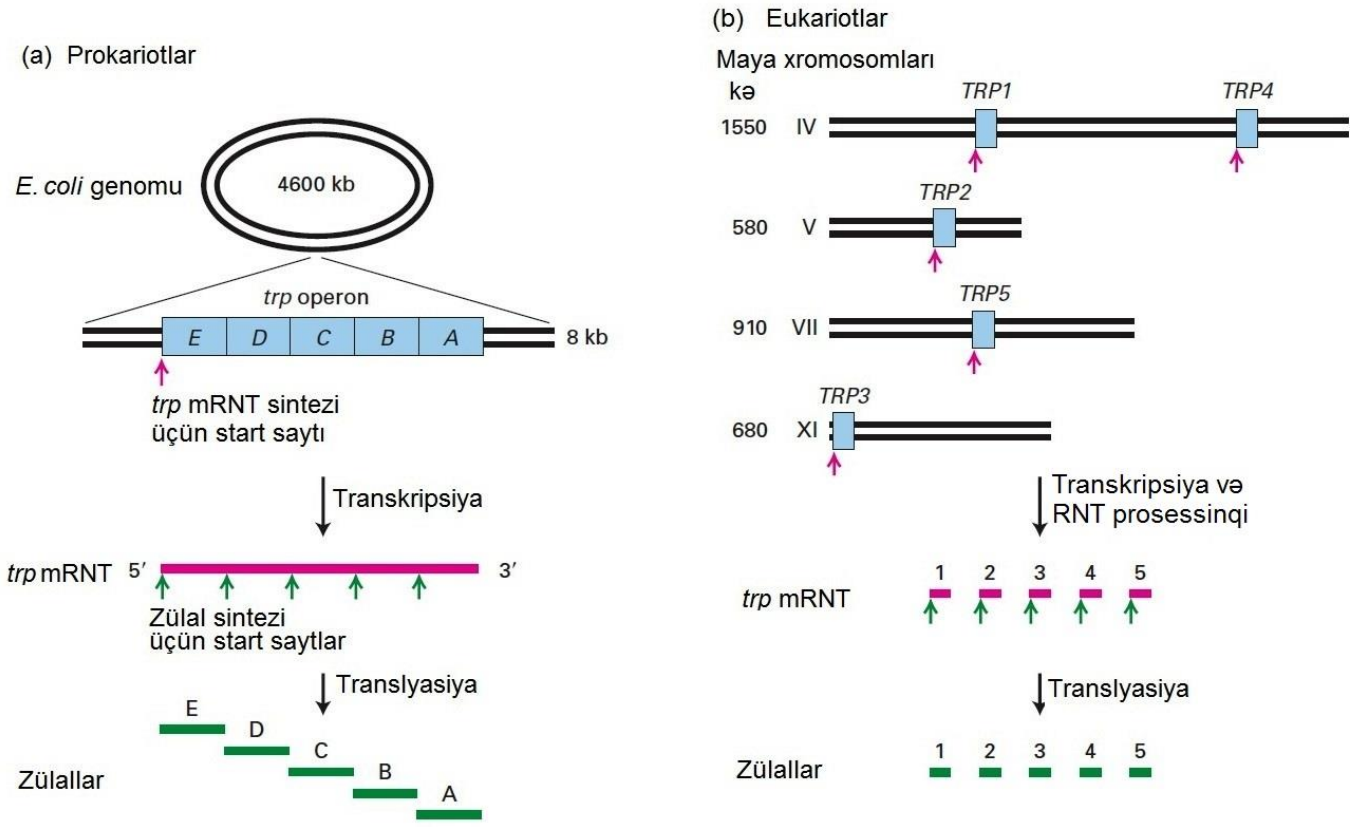
Eukariot Sələf mRNT-lər Funksional mRNT-ləri Əmələ Gətirmək üçün Prosessing Olunurlar

Nüvəsi olmayan bakterial hüceyrələrdə mRNT-nin zülallara translyasiyası hələ onun 3′ sonluğu RNT polimeraza tərəfindən sintez olunub qurtarmadığı andan mRNT-nin 5′ sonluğundan başlaya bilir. Başqa sözlə, bakteriyada transkripsiya və translyasiya eyni vaxtda baş verir. Amma, eukariot hüceyrələrdə fərq tək mRNT-nin nüvədə sintez olunduğu saytın sitoplazmada baş verən translyasiya saytından fərqli olmasında deyil, eləcədə eukariotlarda zülal kodlaşdıran genlərin ilkin transkriptləri sələf mRNT-lər şəklində (pre-mRNT) olur və bu sonuncu, funksional mRNT-nin alınması üçün, *RNT prosessinqi* adlanan bir sıra modifikasiyalara məruz qalmalıdır (bax Şəkil 5-1, mərhələ 2). Sonra bu mRNT zülala translyasiya olunmaq üçün sitoplazmaya daşınmalıdır (eksport olunmalıdır). Beləliklə eukariot hüceyrələrdə trrasnkripsiya və translyasiya eyini vaxtda baş verə bilmir.

Bütün eukariot pre-mRNT-ləri ilkin olaraq hər iki üçündan modifikasiya olunurlar və bu modifikasiyalar mRNT-də saxlanılır. Sintez olunan RNT zəncirinin 5′ sonluğu RNT polimeraza səthindən çıxan kimi o, bir sıra fermentlərin təsirinə məruz qalır və bu fermentlər ona *5′ papaq (5′ cap*) sintez edirlər, 7-metilquanilat RNT-nin 5′ terminal nukleotidinə qeyri adi ardılcıllıqla 5′,5′ trifosfat əlaqəsi ilə birləşir (Şəkil 5-14). Papaq mRNT-ni fermentativ parçalanmaqdan qoruyur və onun sitoplazmaya daşınmasına kömək edir. Papaq həmçinin sitoplazmada translyasiyanın başlanması üçün tələb olunan zülal faktorlarla birləşir.



ŞƏKİL 5-12 Bakterial RNT polimeraza. Bu quruluş, Şəkil 5-11-də göstərilmiş elonqasiya (pillə 4) mərhələsindəki polimeraza molekuluna uyğun gəlir. Bu diaqramda transkripsiya sağa istiqamətdə davam edir. Ox işarələri aşağıya gediş DNT-nin polimerazaya girdiyi və yuxarıya gediş DNT-nin, aşağıyagediş DNT-yə olan bucaq altında çıxdığı yeri göstərir. Templeyt zənciri açıq bənövşəyi, kodlaşdırmayan zəncir isə tünd bənövşəyi rəngdə, yeni sintez olunan RNT isə qırmızı rəngdə göstərilir. RNT polimerazanın β′ subvahidi qızılı rəngdə, β subvahid açıq sarı rəndə və α subvahid isə küncdən qonur rəngdə görünür. Templeyt DNT-yə komplementar olan nukleotidlər transkripsiya köpüyünün sağ tərəfindən yeni sintez olunan RNT zəncirinin 3′ sonluğuna (sol tərəfdə) əlavə olunur. Yeni sintez olunmuş RNT zənciri polimerazadan, aşağıda β subvahid vasitəsilə β və β′ subvahidlərin arasında yaranan kanal vasitəsi ilə çıxır. ω subvahidi də küncdən görünür. [Hörmətlə Seth Darst tərəfindən təqdim olunmuşdur, bax N. Korzheva et al., 2000, *Science* **289**: 619-625, and Opalka et al., 2003, *Cell* **114**:335-345.]



ŞƏKİL 5-13 Prokariot və eukariotlarda genlərin düzülüşü. (a) Triptofan (*trip*) operonu *E.coli* xromosomunun davam edən seqmentidir və triptofanın mərhələli sintezi üçün lazım olan fermentləri kodlaşdıran beş gendən təşkil olunmuşdur (mavi). Tam operon bir promotordan transkripsiya olunub fasiləsiz uzun *trip* mRNT-ni əmələ gətirir (qırmızı). Bu mRNT-nin translyasiyası beş müxtəlif start saytından (başlanğıc nöqtədən) başlayır və beş müxtəlif zülalı əmələ gətirir (yaşıl). Bakterial genomda genlərin ardıcıllığı onların kodlaşdırdığı zülalların, triptofanın sintez yolundakı funksional adıcıllıqları ilə paralleldir. (b) Maya göbələyində (*Saccharomyces cerevisiae*) triptofanın sintezi üçün lazım olan fermentləri kodlaşdıran beş müxtəlif gen dörd müxtəlif xromosomda yerləşirlər. Hər bir gen özünün promotorundan transkripsiya olunur və ilkin transkriptləri əmələ gətirir ki, onlar da prosessinqdən sonra bir zülalı kodlaşdıran funksional mRNT-yə çevrilir. Müxtəlif xromosomların uzunluğu kiloəsaslarla (10^3 əsas) verilmişdir.

Pre-mRNT-nin 3'sonluğunun prosessinqinə bu sonluğun endonukleaza ilə kəsilərək sərbəst 3'-hidroksil qrupunun əmələ gəlməsi və əmələ gəlmiş sərbəst 3'-hidroksil qrupuna ***poli (A) polimeraza*** adlanan ferment vasitəsi ilə bir sıra adenil turşusunun qalıqlarının bir-bir əlavə olunması daxildir. Nəticədə əmələ gəlmiş poli (A) quyruq 100-250 əsasdan ibarət olur, bu onurğalılara nisbətən maya göbələyində və onurğasızlarda qısa olur. Poli (A) polimeraza zülallar kompleksinin bir hissəsi olub transkripti tapıb spesifik (xüsusi) saytdan kəsir, sonra dəqiq miqdarda A qalıqlarını əlavə edir, prosesin gedişində templeyt tələb olunmur. Sonra, bu fəsilin 5.4 bölməsində və Fəsil 10-da müzakirə olunduğu kimi, poli(A) quyruq həm mRNT-nin translyasiyasında həm də nüvədə pre-mRNT-nin stabilləşməsində və tam prosessinq olunmuş mRNT-lərin nüvədə və sitoplazmada stabilləşməsində çox vacib funksiyaya malikdir.

Çoxsaylı müxtəlif eukariotik mRNT molekulları prosessinqinin başqa mərhələsi**,** transkriptin daxili kəsilməsi nəticəsində intronların atılması və kodlaşdırıcı eqzonların bir yerə tikilməsi – **RNT splaysinqi**dir. Şəkil 5-15-də β-qlobin genini nümunə kimi istifadə etməklə eukariotlarda mRNT prosessinqinin əsas mərhələləri ümumiləşdirilmiş şəkildə göstərilir. Biz 10-cu fəsildə mRNT-nin və eləcə də tRNT və rRNT-nin prosessinqini aparan hüceyrə maşınını (mexanzmini) tədqiq edirik.

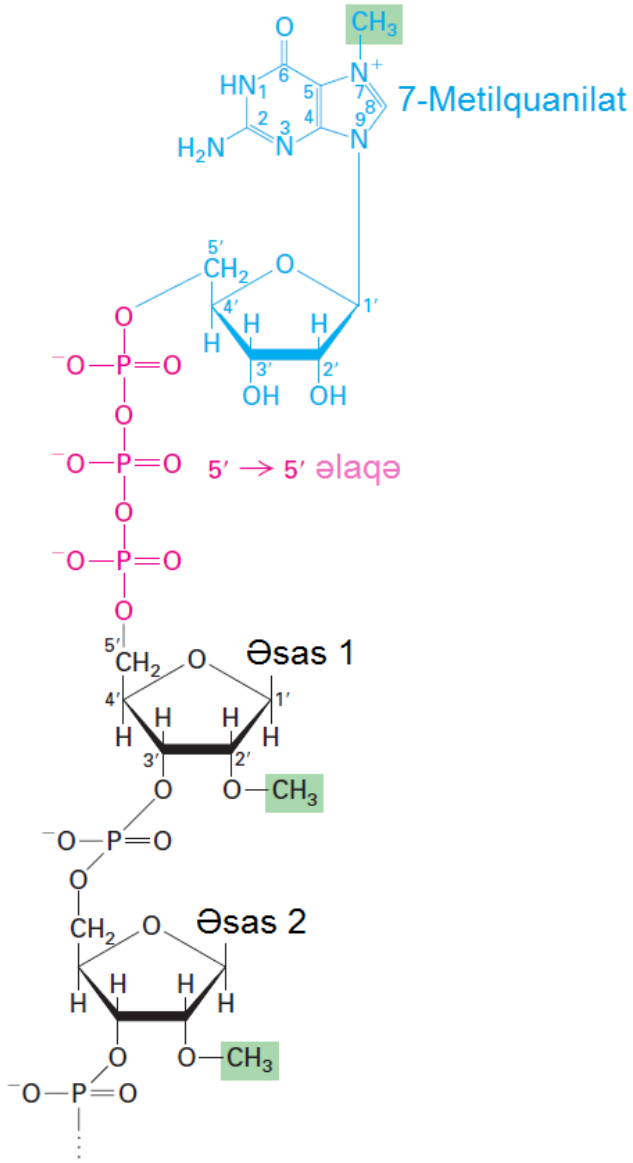
RNT prosessinqi nəticəsində əmələ gələn funksional eukariotik mRNT-lər hələ də molekulun hər iki sonluğunda 5′ və 3′ *translyasiya olunmayan rayonlar* (*untranslated regions - UTRs)* kimi adlandırılan qeyri kodlaşdırıcı rayonlara malik olur. Məməlilərdə 5′ UTR rayonu yüz və ya daha artıq nukleotid uzunluğa malik ola bilir, 3′ UTR rayonu isə bir neçə kiloəsas uzunluqda ola bilir. Bakterial mRNT-lər də adətən 5′ və 3′ UTR-lara malik olurlar, amma bunlar eukariot UTR rayonlara nisbətən çox-çox qısa olurlar, əsasən 10 nukleot uzunluqdan çox olmurlar. Fəsil 10-da müzakirə olunduğu kimi, 5′ UTR və 3′ UTR ardıcıllıq mRNT translyasiyasında və stabilliyində iştirak edirlər, 3′ UTR həmçinin çox mRNT-lərin sitoplazmanın spesifik rayonlarında yerləşməsində fəaliyyət göstərir.

Alternativ RNT Splaysinqi Vahid Eukariotik Gendən Sintez Olunan Zülalların Sayını Artırır.

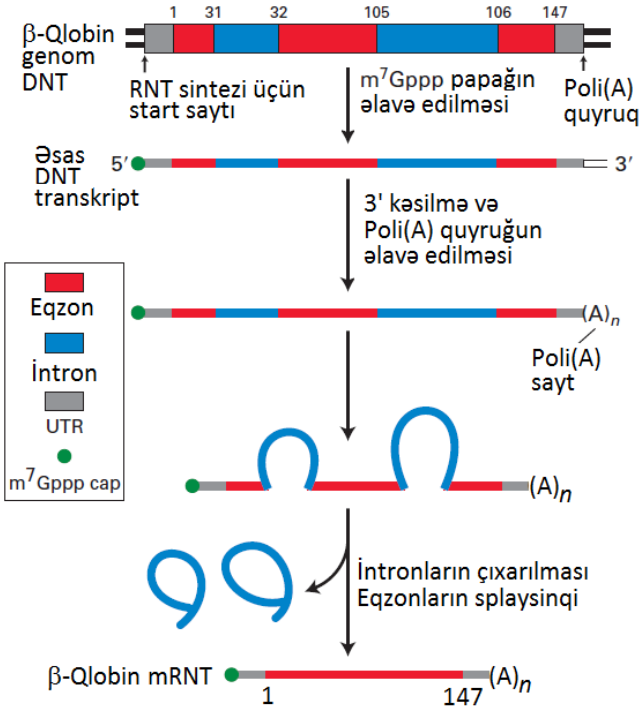
Bakteriyaların və arxeyaların genlərindən fərqli olaraq, çoxhüceyrəli ali eukariotların genlərinin çoxu çoxsaylı intronlara malikdir. Fəsil 3-də göstərildiyi kimi ali eukatriotlarda

çox zülallar çoxdomenli üçüncü quruluşa malikdirlər (bax Şəkil 3-11). Təkrarlanan fərdi zülal domenləri çox hallarda eyni eqzonla və ya genom DNT-sində təkrarlanan və identik və ya çox yaxın aminturşu ardıcıllığına malik olan domenləri kodlaşdıran çox az sayda eqzonlarla kodlaşdırılırlar.

Güman olunur ki, bu cürə təkrarlanan eqzonlar eqzonun hər iki tərəfində intronlardakı iki sayt arasında yerləşən DNT uzunluğunun təsadüfi çoxsaylı duplikasiyası nəticəsində meydana çıxmışdır və nəticədə iki orjinal intron arasında əmələ gələn bir sıra təkrarlanan eqzonlar intronlarla bir-birindən ayrılmışlar. Çox eukariot genlərində, çoxsaylı intronların meydana gəlməsi, funksiyasına görə bir-birinə yaxın olan çox-



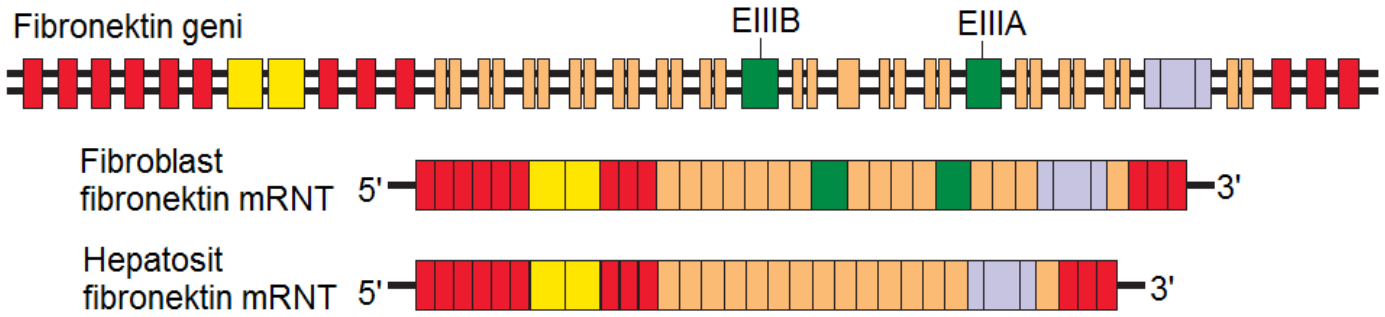
ŞƏKİL 5-14 5′ metilləşmiş papağın quruluşu. Eukariotların mRNT-sində 5′ metilləşmiş papağın fərqləndirici kimyəvi xüsusiyyətləri bunlardan ibarətdir: (1) 7-metilquanilatın mRNT molekulunun ilkin nukleotidinə birləşməsi 5′→5′ vəziyyətindədir; (2) birinci nukleotidin (əsas 1) ribozasının 2′ hidroksilində metil qrupunun olması. Göstərilən hər iki xüsusiyyət bütün heyvan hüceyrələrində və ali bitkilərin hüceyrələrində rast gəlinir; maya göbələyində nukleotid 1-də metil qrupu olmur. Onurğalilarda ikinci nukleotidin də (əsas 2) ribozası metilləşir. [Bax A.J. Shatkin, 1976, *Cell*, 9:645.



ŞƏKİL 5-15 RNT prosessinqinə ümumi baxış. Eukariotlarda RNT prosessinqi funksional mRNT-ni əmələ gətirir. β-qlobin geni üç zülal kodlaşdırıcı eqzona (kodlaşdırıcı rayon, qırmızı) və onların arasında olan iki qeyri kodlaşdırıcı intronlara malikdir. İntronlar zülal kodlaşdırıcı ardıcıllıqlar 31 və 32-ci amin turşu kodonları arasında və 105 və 106-cı aminturşu kodonları arasında qırır. Eukariotik zülal-kodlaşdıran genlərin transkripsiyası birinci amin turşusunu kodlaşdıran ardıcıllıqdan əvvəl başlayır və axırıncı amin turşusunu kodlaşdıran ardıcıllıqdan sonra da davam edir, nəticədə ilkin transkriptin uclarında qeyri-kodlaşdırıcı rayonlar əamələ gəlir. Bu, *translyasiya olunmayan rayonlar* (*UTR*-lar) prosessinq zamanı saxlanılır. 5′ papaq (m^7Gppp) ilkin RNT transkriptin formalaşması zamanı əlavə olunur, bu zaman transkript poli (A) quyruğun yaranması ilə də uzunayır. Poli(A) saytın kəsilməsi və 3′ sonluğa çoxsaylı A qalığının əlavə olunmasından sonra splaysinq intronları aradan çıxarır və eqzonları birləşdirir. Xırda nömrələr β-qlobin ardıcıllığında 147 aminturşu qalıqlarının yerləşmə mvqeyini göstərir.

saylı zülalların alternativ splaysinq yolu ilə vahid bir gendən ekspressiya olunmasına imkan yaradır. Ali eukariotlarda, alternativ splaysinq zülalların izoformalar adlandırılan müxtəlif formalarının müxtəlif tipli hüceyrələr tərəfindən istehsal olunması üçün əhəmiyyətli mexanizmdir.

Məməlilərdə tapılmış multidomen zülal fibronektin alternativ splaysinq üçün yaxşı nümunədir (Şəkil 5-16). Fibronektin uzun, yapışqan zülal olub hüceyrələrarası mühitə ifraz olunur və başqa zülalların bir-birinə bağlanmasını həyata keçirir. Nəyi və harada bağlamaq splaysinq zamanı hansı domenlərin bir yerdə qalmasından asılıdır. Fibronektin geni, zülalların spesifik domeninə uyğun olaraq bir neçə rayonda qruplaşmış çoxsaylı eqzona malikdir. Fibroblastlar tərkibinə EIIIA və EIIIB eqzonlar daxil olan fibronektin mRNT molekulunu istehsal edirlər, bu eqzonlar fibroblastın plazma membranında zülallara möhkəm şəkildə birləşən zülal domenini kodlaşdırır. Nəticədə, fibronektinin bu izoforması fibriblastları hüceyrəxarici matrisaya yapışdırır. Qara ciyərin əsas hüceyrə ti-



ŞƏKİL 5-16 Alternativ splaysinq. ~75-kə fibronektin geni (yuxarıda) çoxsaylı eqzonlara malikdir, fibronektinin splaysinqi hüceyrənin tipindən asılı olaraq dəyişilir. EIIIB və EIIIA eqzonlar (yaşıl) fibroblastın səthində xüsusi zülallar üçün birləşdirici domenləri kodlaşdırır. Fibroblastda əmələ gələn fibronektin mRNT molekuluna hər iki - EIIIB və EIIIA eqzonlar daxil olur, amma, bu eqzonlar hepatositlərdə əmələ gələn fibronektin mRNT-də splaysinqlə aradan götürülür. Bu diaqramda intronlar (qara xətlər) öz miqyasında çəkilməməşdir, onların çoxu istənilən eqzondan çox-çox uzundur.

pi olan hepatositlərdə fibronektinin ilkin transkriptinin alternativ splaysinqi nəticəsində EIIIB və EIIIA eqzonların olmadığı mRNT əmələ gəlir. Nəticədə, hepatositlərin qana ifraz etdiyi fibrinektin fibroblastlara və ya çox sayda başqa tip hüceyrələrə sıx şəkildə yapışmır və sərbəst şəkildə dövrə edə bilir. Amma, qan laxtalanmasının (trombun) əmələ gəlməsi zamanı, hepatosit fibronektinin fibrin-birləşdirən domenləri qan laxtasının əsas tərkib hissələrindən olan fibrinə birləşir. Sonra birləşmiş fibronektin keçməkdə olan trombositlərin membranındakı inteqrinlərlə qarşılıqlı əlaqəyə girir və trombositləri tromblara əlavə etməklə onu böyüdür (genişləndirir).

Fibronektinin 20-dən artıq müxtəlif izoforması aşkar edilmişdir, hər biri müxtəlif alternativ splaysinq yolu ilə fibronektin genin eqzonlarının unkal kombinasiyasından ibarət olan mRNT-lər tərəfindən kodlaşdırılır. Müxtəlif toxumalardan ayrılmış çox sayda mRNT-lərin nukleotid ardıcıllığının oxunması və onların ardıcıllığının genom DNT-si ilə müqayisəli analizi göstərdi ki, insanın bütün genlərinin 90 faizə yaxını alternativ splaysinq olunmuş mRNT-lər şəklində ekspressiya olunurlar. Aydın olur ki, alternativ RNT splaysinqi ali, çoxhüceyrəli orqanizmlərun genomu tərəfindən kodlaşdırılmış zülalların sayını güclü şəkildə artırır.

5.2 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Zülal Kodlaşdıran Genlərin Transkripsiyası və Funksional mRNT-lərin Formalaşması

- DNT-nin transkripsiyası, böyüməkdə olan RNT zəncirinin 3′ sonluğuna hər dəfə bir nukleotid əlavə olunmaqla RNT polimeraza ilə aparılır (bax Şəkil 5-11). Templeyt DNT zəncirinin ardıcıllığı, RNT zəncirini yaratmaq üçün ribonukleotidlərin polimerləşmə ardıcıllığını təyin edir.
- Transkripsiyanın inisiasiyası zamanı RNT polimeraza DNT-nin xüsusi saytına (promotora) birləşir, cütləşməmiş templeyt zənciri açmaq üçün lokal olaraq ikiqat zəncirli DNT-ni əridir və templeyt zəncirə komplementar olan ilk iki nukleotidi polimerləşdirir. 12-14 əsas cütü uzunluqda ərimiş rayon transkripsiya köpüyü kimi adlandırılır.
- Zəncirin elonqasiyası zamanı, RNT polimeraza DNT üzərində aşağıya istiqamətdə hərəkət edir, DNT-ni polimerazanın önündə əridərək onun templeyt zəncirinə imkan yaradır ki, fermentin fəal mərkəzinə daxil olsun və komplementar zəncirə imkan verir ki, transkripsiyanın ardınca yenidən templeyt zəncirlə cütləşsin. Transkripsiya köpüyü polimeraza ilə birlikdə hərəkət etdikcə ferment templeyt zəncirə komplementar olan ribonukleotidləri uzunamaqda olan RNT zəncirinin 3′ sonluğuna əlavə edir.
- RNT polimeraza DNT-də terminasiya ardıcıllığına çatanda ferment transkripsiyanı dayandırır, tamamlanmış RNT zəncirini azad edir və ferment templeyt DNT-dən dissosasiya edir.
- Prokariotik DNT-də bir neçə zülal kodlaşdıran gen bir funksional rayonda operon adlanan ümumi klastreri əmələ gətirir, bu vahid bir promotordan yaxın funksiyaya malik olan çoxsaylı müxtəlif zülalları kodlaşdıran bir mRNTyə transkripsiya olunur (bax Şəkil 5-13a). Bakterial mRNT-nin translyasiyası mRNT-nin sintezi tamamlanmadan başlaya bilir.
- Eukariotik DNT-də hər zülal kodlaşdıran gen öz promotorundan transkripsiya olunur. İlk başlanğıc transkript əksər hallarda kodlaşdıran rayonlar (eqzonlar) arasında "səpilmiş" vəziyyətdə olan kodlaşdırmayan rayonlara (intronlara) malik olur.
- İlkin eEukariotik transkriptlər, funksional RNT-lərin alınması üçün RNT prosessinqindən keçməlidirlər. Prosessinq zamanı zülal-kodlaşdıran genlərin ilkin transkriptinin demək olar ki, hamısının ucları 5′ papaq və 3′ poli (A) quyruq əlavə olunmaqla modifikasiya olunur. İntronlara malik olan genlərin transkriptləri splaysinqə, intronların atılmasına və eqzonların birləşdirilməsinə məruz qalırlar (bax Şəkil 4-15).
- Eukariot hüceyrələrdə çoxdomenli zülalların fərdi (ayrıca) domeni çox hallarda fərdi eqzon və ya az saylı eqzonlarla kodlaşdırılır. Belə zülalların fərqli izoformaları eqzonların alternativ splaysinqinin nəticəsi kimi çox hallarda xüsusi hüceyrələrdə ekspressiya olunurlar.

5.3 mRNT Kodunun tRNT ilə Açılması.

Baxmayaraq ki, zülalların sintezi barədə informasiyanı DNT saxlayır və DNT-də kodlaşdırılan informasiyanı mRNT ötürür, amma əsas bioloji fəallıq zülallarla həyata keçirilir. Fəsil 3də gördüyümüz kimi, hər bir zülalda amin turşlarının xətti

ardıcıllığı onun fəallığını və üç-ölçülü quruluşunu təyin edir. Bu səbəbdən amin turşularının DNT-də kodlaşdırıldığı kimi düzgün yığılması, funksional zülal istehsalı baxımından və uyğun olaraq hüceyrələrin və orqanizmlərin dəqiq fəaliyyəti baxımından kritik əhəmiyyətlidir.

Translyasiya tam bir proses olub mRNT-nin nukleotid ardıcıllığı templeyt kimi istifadə olunaraq amin turşularının polipeptid zəncirində düzgün ardıcıllıqla birləşməsi həyata keçirilir (bax Şəkil 5-1 pillə 3). Eukariot hüceyrələrdə zülalların sintezi sitoplazmada baş verir, burada üç tip RNT molekulları bir araya gəlib müxtəlif, amma kooperativ funksiyanı həyata keçirirlər (Şəkil 5-17).

1. Məlumat RNT-si (mRNT) DNT-dən transkripsiya olunan genetik informasiyanı xətti formada daşıyır. mRNT-lər kodonlar adlandırılan üç-nukleotid ardıcıllıqlarının dəsti kimi oxunur ki, hər biri xüsusi bir amin turşusunu müəyyən edir.

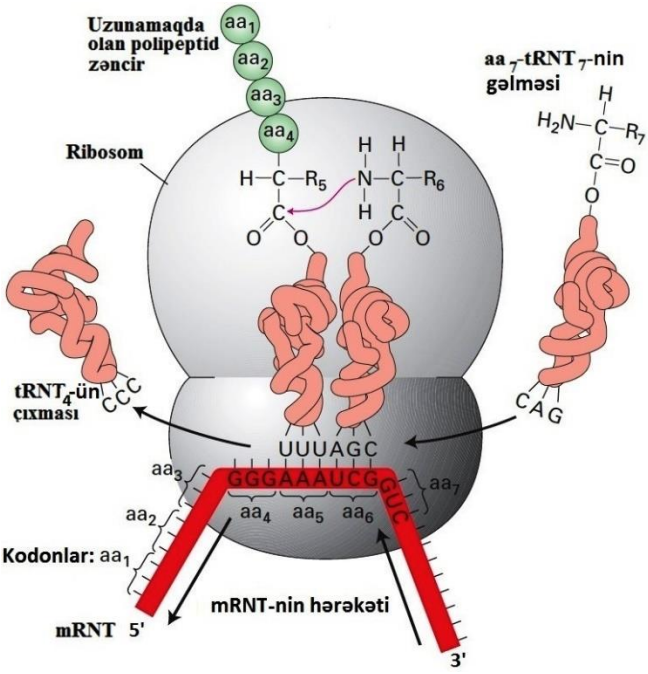
2. Nəqliyyat RNT-si (Transfer RNA - tRNT) mRNT üzərində kodonları oxumaq (açmaq) üçün əsas açar rolunu oynayır. Hər tip amin turşusu özünün tRNT dəstinə malikdir, onlar mRNT-nin çağırışına (tələbinə) uyğun olaraq amin turşusuna kovalent birləşib onu polipeptid zəncirinin uzunamaqda olan ucuna aparırlar. Hər bir mərhələdə düzgün tRNT molekulu ona qoşulmuş amin turşusu ilə seçilir, çünki hər bir spesifik tRNT molekulu üç-nukleotid ardıcıllığından ibarət olan bir antikodona malikdir və bu antikodon mRNT üzərində ona komplementar olan (üç-nukleotid ardıcıllığından ibarət) kodonla əsas-cütü əmələ gətirə bilir.

3. Ribosomal RNT (rRNT) zülallar dəsti ilə birləşərək (assosasiya edərək) **ribosomları** əmələ gətirirlər. Fiziki olaraq mRNT boyunca hərəkət edən bu kompleks quruluş amin turşularının polipeptid zəncirində yığılmasını kataliz edir. Onlar həmçinin tRNT-ni və zülal sintezi üçün lazım olan bir sıra köməkçi zülalları birləşdirirlər. Ribosomlar böyük və kiçik subvahidlərdən təşkil olunmuşlar və bu subvahidlərin hər biri özünün rRNT molekuluna və ya molekullarına malikdirlər.

Bu üç tip RNT molekulları bütün orqanizmlərdə zülalların sintezində iştirak edirlər. Bu bölmədə biz diqqətimizi mRNT kodunun tRNT adaptorlarla açılmasına yönəldirik və göstəririk ki, bu RNT-lərin hər birinin quruluşu onların xüsusi funksiyasına necə uyğundur. Növbəti bölmədə isə zülal sintez etmək üçün onların rRNT, ribosomlar və başqa zülal faktorlarla birlikdə necə işləməsi göstərilir. Translyasiya zülal sintezi üçün çox əhəmiyyətli olduğundan, belə hesab edilir ki, ümumiyyətlə bu iki prosess qarşılıqlı əlaqədədir. Amma, translyasiya nəticəsində əmələ gəlmiş polipeptid zəncir, post-translyasiya bükülməsinə və əksər hallarda, yetkin funksional zülalın alınması üçün (Fəsil 3) tələb olunan başqa dəyişikliklərə də (məsələn, kimyəvi modifikasiyalara, digər zəncirlərlə assosasiyalara və sair) məruz qalır .

Məlumat RNT İnformasiyanı DNT-dən Üç-Hərfli Genetik Kod Şəklində Daşıyır

Yuxarıda qeyd olunduğu kimi, hüceyrələr tərəfindən istifadə olunan genetik kod ***triplet*** koddur, hər üç-nukleotid ardıcıllığı və ya kodon mRNT-də xüsusi start nöqtəsindən "oxunur". Genetik kodda mümkün olan 64 kodondan (hər birində dörd nukleotiddən biri kodonun üç pozisiyanın hər birində olanda 4 × 4 × 4 = 64 alınır) 61-i fərdi amin turşularını dəqiq müəyyən edir, üçü isə stop kodonlardır. Cədvəl 5-1 göstərir ki, amin turşularının çoxu birdən artıq kodonla kodlaşdırılır. Yalnız iki amin turşusu - metionin və triptofan hər biri bir kodonla kodlaşdırılır, leysin, serin, və arginin hər biri altı müxtəlif kodonla kodlaşdırılır. Eyni amin turşusu üçün istifadə olunan müxtəlif kodonlara *sinonimlər* deyilir. Kod özlüyündə *cırlaşandır* (*degenerativ),* bu onu göstərir ki, bir amin turşusu bir neçə kodonla tanına bilir.



ŞƏKİL 5-17 Zülalların sintezində RNT-nin üç rolu. Məlumat RNTsi (mRNT) nəqliyyat RNT (tRNT) və çoxsaylı zülallardan və üç (bakteriyalarda) və ya dörd (eukariotlarda) ribosomal RNT (rRNT) molekullarından (göstərilməyib) təşkil olunmuş ribosomun birlikdə fəaliyyəti ilə zülala translyasiya olunur. tRNT-nin antikodonu ilə mRNT-nin ona komplementar olan kodonu arasında əsas cütlərinin əmələ gəlməsi göstərilir. Yaxınlaşmaqda olan aa-tRNT-nin N sonluqlu amin qrupu ilə böyüməkdə olan zülalın karboksil sonluqlu C (yaşıl) arasında peptid əlaqələrin əmələ gəlməsi rRNT-lərin biri ilə kataliz olunur. aa - aminturşu, R - yan qrupdur. Qeyd edək ki, bunlar tRNT-lərin və ribosomal subvahidlərin sadələşdirilmiş diaqramlarıdır. Onların əsil quruluşu Şəkil 5-20b və Şəkil 5-22-də göstərilir.

Prokariot və eukariot hüceyrələrdə polipeptid zəncirinin sintezi metionin amin turşusu ilə başlayır. Bakteriyalarda metioninin formil qrupu birləşmiş xüsusi forması – formil metionin istifadə olunur. mRNT-lərin çoxunda *start (insiator*) kodon, amin-sonluqlu metionin amin turşusunu tanıyan AUG-dir. Çox az sayda bakterial mRNT-lərdə GUG insiator kodon kimi istifadə edilir və bəzi hallarda eukariotlarda CUG metionin üçün insiator kodon kimi istifadə olunur. Üç kodon UAA, UGA, və UAG heç bir amin turşusunu tanımır, amma *stop* (*teerminasiya*) *kodonu* rolunu oynayırlar və demək olar ki, bütün heceyrələrdə polipeptid zəncirinin karboksil sonluğunu nişanlayırlar. Spesifik start kodondan başlayaraq stop (terminal) kodona qədər oloan bütün kodonların ardıcıllığı **oxunan çərçivə** adlanır. Ribonukleotidlərin mRNT-də üçlü qruplar şəklində belə dəqiq

xətti düzülüşü amin turşularının polipeptid zəncirində dəqiq xətti ardıcıllığını ifadə edir və polipeptid zəncirin sintezinin başlanması və dayanması siqnallarını verir.

Genetik kod kodonlar arasında bölünməyən və bir-birini örtməyən triplet kodlar olduğundan istənilən mRNT nəzəri olaraq üç oxunan çərçivədə translysiya oluna bilər. Həqiqətən də, göstərilmişdir ki, bəzi mRNT-lər bir-birini örtən informasiyalara malik olurlar və onlar müxtəlif oxunan çərçivədə translysiya olunaraq müxtəlif polipeptidləri əmələ gətirirlər (Şəkil 5-18). Amma, mRNT-lərin böyük əksəriyyəti yalnız bir çərçivədə oxunur, çünki başqa çərçivədə stop kodon çox tez rast gəlinərdi və funksional zülal tam sintez olunmadan translysiya qırıla bilərdi. Çox nadir hallarda, *çərçivə-sürüşməsi* nəticəsində başqa bir qeyri adı kodlaşdırıcı tənzimləmə rast gəlinir. Bu halda, zülal sintez edən maşın dörd nukleotidi bir aminturşu kodonu kimi oxuyur və sonra normal tripletləri oxumağı davam edir və ya o, bir əsasdan yan keçib sonra gələn bütün əsasları yeni çərçivə daxilində zəncirin terminasiya kodonu çatana kimi oxuyur. Yalnız çox az belə nümunə məlumdur.

Hər bir kodonun mənası məlum olan bütün orqanizmlərin əksəriyyətində demək olar ki eynidir - bu yer üzərində həyatın yalnız bir dəfə əmələ gəlməsi barədə güclü arqumentdir. Faktiki olaraq, cədvəl 4-1-də göstərilən genetik kod *universal kod* kimi məlumdur. Amma, məlum olmuşdur ki, kirpikli ibtidailərdə və birhüceyrəli bitki *Acetabularia*-da bir çox mitixondri genetik kodları bir neçə kodonda fərqlənirlər. Bu fərqlərin çoxu, Cədvəl 5-2-də göstərildiyi kimi, bir aminturşusunun başqası kimi oxunması deyil normal stop kodonun amin turşusu kimi oxunmasıdır. Genetik kodun universallığında olan bu istisnalar təkamülün sonralar inkişafı prosesində olmuşdur, yəni, heç bir zaman kod heç bir dəyişikliyə uğramamışdı, hərçənd ki, təkamülün əvvəlində ilkin genetik kod fəaliyyətə başlayan zaman baş verən kütləvi dəyişikliklər qəbul edilməmişdir.

tRNT-nin Bükülmüş Quruluşu Onun Kod Oxuma Funksiyasını Artırır.

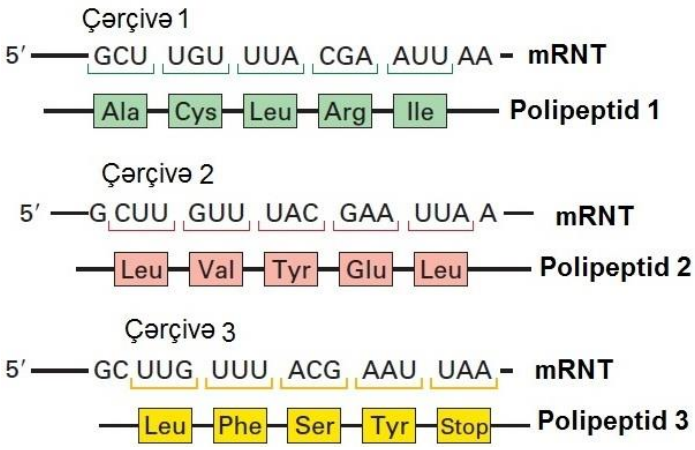
DNT-nin və RNT-nin dörd nukleotidli dilindən 20 amin turşulu zülal dilinə translysiya və ya kodun açılması tRNT-ləri və ***aminoasil-tRNT sintetaza*** fermentinin iştirakını tələb edir. Zülal sintezində iştirak etmək üçün tRNT molekulu kimyəvi yolla yüksək enerjili rabitə ilə müvafiq amin turşusu ilə əlaqəyə girməli və aminoasil-tRNT əmələ gətirməlidir (Şəkil 5-19). tRNT-də olan antikodon sonra mRNT-də olan kodonla əsas cütü əmələ gətirir və fəallaşmış amin turşusu uzunamaqda olan polipeptid zəncirinə əlavə edilir (bax Şəkil 5-17).

Təxminən 30-40 müxtəlif tRNT molekulu bakteriyal hüceyrələrdə və 50-100 molekul heyvan və bitki hüceyrələrində tapılmışdır. Beləliklə, hüceyrələrin çoxunda tRNT-lərin sayı zülalların sintezində iştirak edən amin turşuların sayından (20) çoxdur, həmçinin genetik kodda olan aminturşusu kodonlarının sayından (61) fərqlənir. Uyğun olaraq, amin turşularının çoxu birdən artıq tRNT-yə qoşula bilmək qabliyyətindədir (bu tRNT-lərin sayının amin turşularının sayından çox olmasının izahını verir), bundan əlavə, tRNT-lərin çoxu birdən artıq kodonla cütləşə bilirlər (bu kodonların sayının mRNT-lərin sayınından çox olmasının izahını verir).

CƏDVƏL 5-1 Genetik kod (Kodonlar aminturşulara)*

Birinci mövqe (5′ sonluq)	**İkinci mövqe**					**Üçüncü mövqe (3′ sonluq)**
	U	C	A	G		
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U	
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C	
	Leu	Ser	Stop	Stop	A	
	Leu	Ser	Stop	Trp	G	
C	Leu	Pro	His	Arg	U	
	Leu	Pro	His	Arg	C	
	Leu	Pro	Gln	Arg	A	
	Leu (Met)*	Pro	Gln	Arg	G	
A	İle	Thr	Asn	Ser	U	
	İle	Thr	Asn	Ser	C	
	İle	Thr	Lys	Arg	A	
	Met (Start)	Thr	Lys	Arg	G	
G	Val	Ala	Asp	Gly	U	
	Val	Ala	Asp	Gly	C	
	Val	Ala	Glu	Gly	A	
	Val (Met)*	Ala	Glu	Gly	G	

*AUG ən çox rast gəlinən start kodondur; adətən GUG valini və CUG leysini kodlaşdırır, amma çox nadir hallarda bu kodonlar metionini kodlaşdıraraq inisiator kodonu rolunu oynayırlar.



ŞƏKİL 5-18 Üst-üstə düşməyən, vergülsüz triplet kod - genetik kodun müxtəlif çərçivələrdə necə oxuna bilməsi barədə nümunələr. Əgər göstərilən mRNT ardıcıllığının translyasiyası yuxarıya istiqamətdə üç müxtəlif start saytından (göstərilməyib) başlayırsa, onda üç üst-üstə düşən oxunan çərçivə mümkün olur. Bu nümunədə, orta çərçivədə kodon bir əsas sağa sürüşmüşdür, stop kodonda qurtaran üçüncü çərçivədə isə iki əsas sağa sürüşmüşdür. Nəticədə, translyasiya prosesində eyni nukleotid ardıcıllığı fərqli amin turşularını tanıyır. Baxmayaraq ki, üç mümkün olan oxunma çərçivəsinin birindən artığında translyasiya olunan ardıcıllıq rayonları nadir hallarda olur, amma bir çox belə üst-üstə düşən hallar eukariot və prokariot hüceyrələrinin genlərində, xüsusən də onların eyni DNT ardıcıllığından istifadə edərək iki alternativ mRNT ekspressiya edən viruslarda müşahidə edilmişdir, ardıcıllıq bir oxunan çərçivədə bir mRNT üçün istifadə edilmişdir, alternativ oxunan çərçivə isə digər mRNT üçün istifadə edilmişdir. Hətta elə hallar olmuşdur ki, eyni qısa ardıcıllıq mümkün olan hər üç oxunan çərçivədə oxunmuşdur.

Cədvəl 5-2 Universal Genetik koddan məlum olan kənaraçıxmalar

Kodon	Universal kod	Qeyri adi kod*	Rast gəlinməsi
UGA	**Stop**	**Trp**	*Mycoplasma, Spiroplasma,* çoxsaylı növlərin mitoxondriləri
CUG	**Leu**	**Thr**	Maya göbələyinin mitoxondrisi
UAA, UAG	**Stop**	**Gln**	*Acetabularia, Tetrahymena, Paramecium,* və sair
UGA	**Stop**	**Cys**	Euplotlar

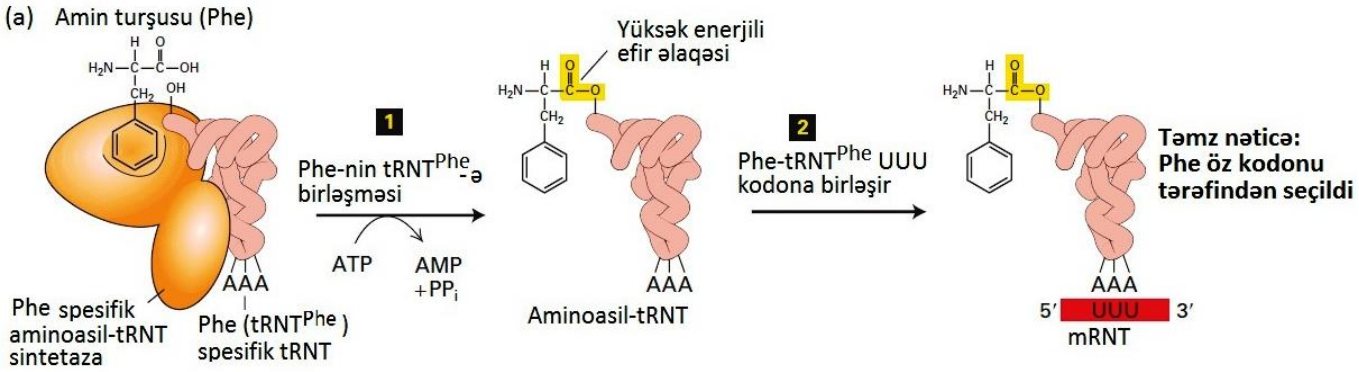
* Göstərilmiş orqanizmlərin nüvə genlərində və və mitoxondri genlərində tapılmışdır.
MƏMBƏ: Osawa et al., 1992, Micribiol. Rev. 56:229

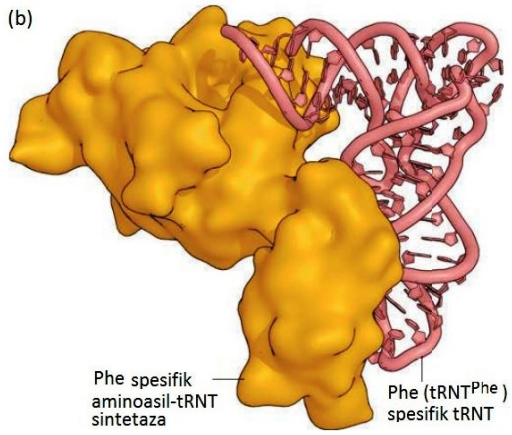
70-80 nukleotid uzunluqda olan tRNT molekulunun funksiyası onun dəqiq üç-ölçülü quruluşundan asılıdır. Məhlulda bütün tRNT molekulları oxşar sütun-ilgək düzülüşlü şəkildə bükülür, bu da ikiölçülü çəkiliş zamanı yonca yarpağına bənzəyir (Şəkil 5-20a). Uotson-Krip əsas cütləri ilə stabilləşən dörd sütun qısa ikiqat zəncir şəklindədir; dörd sütundan üçü sonluqlarında yeddi və ya səkkiz nukleotiddən ibarət olan ilgəyə malikdir, qalan dördüncü ilgəksiz sütun zənciri sərbəst 3′ və 5′ sonluqlara malikdir. Antikodonu əmələ gətirən üç nukleotid orta ilgəyin mərkəzi hissəsində, kodon-antikodon cütləşməsi üçün asan əldə oluna bilən hissədə yerləşir. Bütün tRNT-lərdə, ilgəksiz *aminturşu-tutan sütunun* (*amino acid acceptor stem*) 3′ sonluğunda CCA ardıcıllığı durur, əksər hallarda bu tRNT sintez olunub qurtardıqdan sonrakı prosessinq zamanı əlavə olunur. tRNT-lərin çoxunda bəzi əsaslar transkripsiyadan sonra da modifikasiya olunur və inozin, dihidrouridin və psevdouridin kimi qeyri standart nukleotidləri yaradır. Bizim tezliklə görəcəyimiz kimi, bu modifikasiya olunmuş əsaslardan bəziləri zülalların sintezində əhəmiyyətli rol oynamaları ilə tanınırlar. Üç ölçülü görünüşdə olan, bükülmüş tRNT molekulu, antukodon ilgək və iki dirsəyin uclarını əmələ gətirən aminturşu-tutan (akseptor) sütun ilə "L" formasını alır (Şəkil 5-20b).

Kodon və Antikodon Arasında Tez-tez Qeyri Standart Əsas Cütləri Əmələ Gəlir.

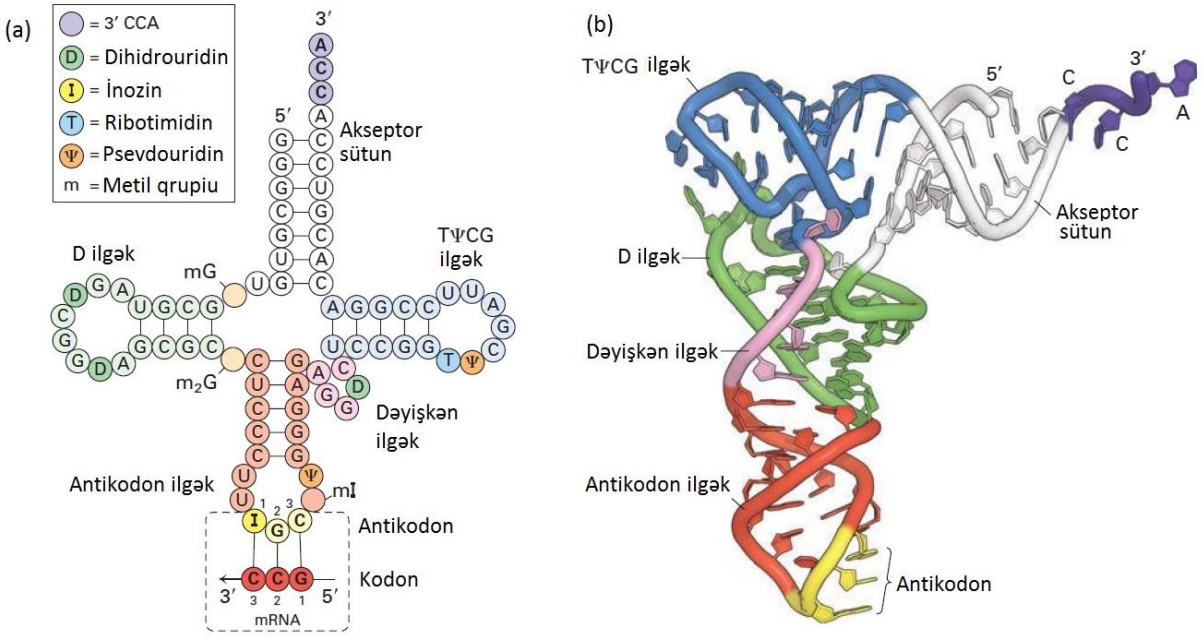
Əgər kodon və anti kodon arasında mükəmməl Uotson-Krik əsas cütlərinin əmələ gəlməsi tələb olunursa, o zaman hüceyrələrin ən azı 61 müxtəlif tipli tRNT-ləri, hər bir kodon üçün amin turşusunu tanıyan bir tRNT-si olmalıdır. Amma, yuxarıda qeyd olunduğu kimi, hüceyrələrin çoxu 61-dən az tRNTə malikdirlər. Sayın bu qədər kiçik olmasının izahı ondadır ki, tək bir tRNT birdən artıq antikodonu tanıma qabliyyətinə malikdir, lakin mütləq deyil ki, bütün kodonlar verilmiş amin turşusuna uyğun gəlsinlər. Bu cürə geniş tanınma, ***yelləncək*** kimi adlandırılan mövqedə olan əsaslar arasında qeyri standart cütləşmə nəticəsində meydana çıxa bilir: bu mRNT kodonunun üçüncü (3′) əsası və ona uyğun olan tRNT antikodonun birinci (5′) əsasıdır.

Kodonun birinci və ikinci əsasları demək olar ki, həmişə uyğun olan antikodonun ikinci və üçüncü əsasları ilə standart Uotson-Krik əsas cütlərinin əmələ gətirirlər, amma, yelləncək vəziyyətdə olan əsaslar arasında dörd qeyri standart qarşılıqlı əlaqə əmələ gələ bilər. G•U əsas cütlərinin əmələ gəlməsi xüsusilə əhəmiyyət kəsb edir, çünki o antikodon və kodon arasında əmələ gələn 3-əc RNT-RNT ikiqat zəncir rayonuna və quruluş etibarı ilə demək olar ki, standard G•C əsas cütlərinə uyğun gəlir. Beləliklə, birinci (yelləncək) vəziyyətində G olan tRNT antikodon üçüncü vəziyyətində pirimidinlərdən biri (C və ya U) olan müvafiq iki kodonla əsas cütləri əmələ gətirə bilir (Şəkil 5-21). Məsələn, fenilalaninin kodonları UUU və UUC (5′→3′) hər ikisi antikodonu GAA (5′→3′) olan tRNT tərəfindən tanınır. Faktiki olaraq, NNPyr (N = istənilən əsas; Pyr = pirimidin) ardıcıllıqlı istənilən iki kodon tək bir amin turşusunu kodlaşdırır və onun kodu antikodonunda birinci (yelləncək) vəziyyətdə G olan vahid tRNT tərəfindəın açılır.





ŞƏKİL 5-19 Nuklein turşusu ardıcıllığının amin turşusu ardıcıllığına çevrilməsi. (a) mRNT-də nuklein turşusu ardıcıllığının zülalların amin turşusu ardıcıllığına translyasiyası prosesinə iki pillə daxildir. Pillə 1: Birinci pillədə aminoasil-tRNT sintetaza spesifik amin turşusunu yüksək enerjili efir əlaqəsi ilə (sarı) uyğun olan tRNT-nin terminal adenozin qalığının 2′ və ya 3′ hidroksil qrupu ilə birləşdirir. Pillə 2: Sonra tRNT-nin üç əsaslı ardıcıllığı (antikodon) mRNT üzərində ona qoşulmuş aminturşunu tanıyan kodon ilə cütləşir. Əgər, bu mərhələlərin hər hansı birində səhv gedərsə o zaman səhv amin turşu polipeptid zəncirinə birləşə bilir. Phe = fenilalanin amin turşusu. (Qeyd edək ki, bu $tRNT^{Phe}$ sadələşdirilmiş diqramıdır, onun əsil quruluşu Şəkil 5-20b-də göstərilir.) (b) İnsanın Phe üçün mitoxondrial aminoasil-tRNT sintetazasının $tRNT^{Phe}$ ilə kompleksdə molekulyar modeli. [Verilənlər Klipcan L., et al., 2012. *J. Mol. Biol*. **415**:527, PDB ID 3tup.]



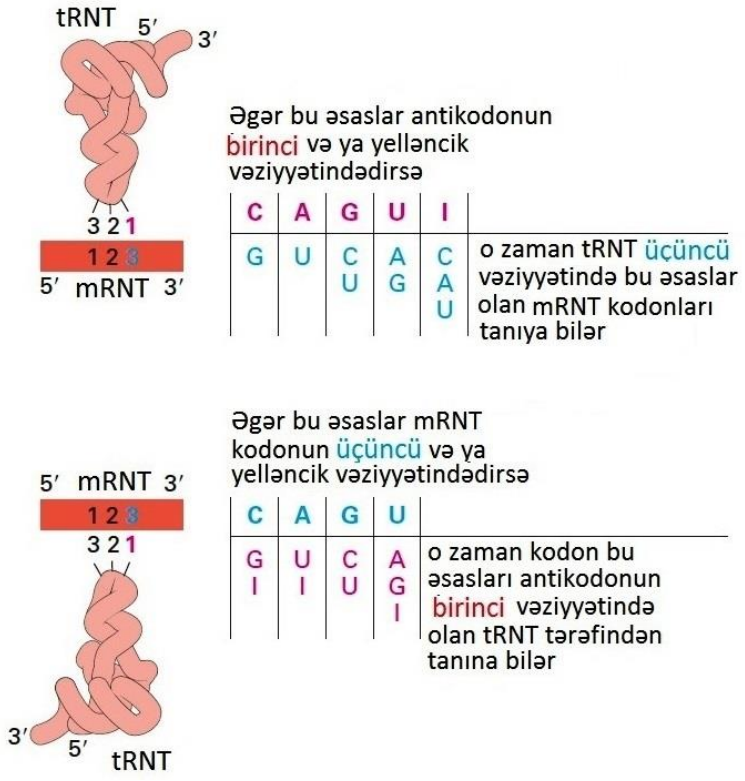
Şəkil 5-20 tRNT-lərin quruluşu. (a) Baxmayaraq ki, tRNT-lər dəqiq nukleotid ardıcıllıqlarına görə fərqlənirlər, onların hamısı əsas-cütləri ilə əmələ gəlmiş dörd sütun və üç ilgək şəkilində bükülürlər. 3′ sonluğunda CCA ardıcıllığı həmçinin bütün tRNT-lərdə tapılmışdır. Amin turşusunun 3′A -ya qoşulması **aminoasil-tRNT-ni** əmələ gətirir. Bəzən A, C, G, və U qalıqları tRNT-lərin çoxunda transkripsiyadan sonra (posttraskripsiya) modifikasiya olunur (bax açara). Dihidrouridin (D) demək olar ki, həmişə D ilgəyində olur, göründüyü kimi ribotimidin (T) və psevdouridin (Ψ) həmişə TΨCG ilgəyində olur. Burada göstərilən maya göbələyinin tRNT-si digər modifikasiya olunmuş əsaslara da malikdir. Antikodon ilgəyin ucunda olan triplet mRNT-də uyğun olan kodonla əsas-cütü əmələ gətirir. Bax R. W. Holly et al., 1965, *Science* **147**:1462. ((b) Bütün tRNT-lərin özülünün ümumiləşdirilmiş üç-ölçülü quruluş modeli. Molekulun L formasına diqqət yetirin. [(b)hissə J. G. Arnez and D. Moras, 1997, *Trends Biochem. Sci.* **22**:211, PDB ID 1vtq.]

Baxmayaraq ki, adenin çox nadir hallarda antikodonda ***yelləncək*** vəziyyətində rast gəlinir, heyvan və bitki mənşəli tRNT-lərdə bu vəziyyətdə adeninin deaminləşmiş məhsulu olan inozin (I) olur. İnozun A, C, və U ilə qeyri standart əsas cütləri əmələ gətirə bilir. Yelləncək vəziyyətində inozin olan tRNT beləliklə üçüncü (yelləncək) vəziyyətində A, C və U olan müvafiq mRNT kodonlarını tanıya bilir (bax Şəkil 5-21). Bu səbəbdən, tərkibində inozin olan tRNT-lər güclü şəkildə tək bir aminturşunu tanıyan sinonium kodonlarının translyasiyasında istifadə olunur. Məsələn, leysinin altı kodonundan dördü (CUA, CUC, CUU və UUA), antikodonu 3′-GAI-5′ olan eyni tRNT ilə tanınır; yelləncək vəziyyətində inozin bu dörd kodonun hər birinin üçüncü əsası ilə qeyri standart əsas-cütləri əmələ gətirir. UAA kodonu olan halda, antikodonun 3 vəziyyəti ilə kodonun 1 vəziyyəti arasında qeyri standart G•U cütlüyü formalaşır.

Amin Turşuları tRNT-lərə Kovalent Rabitə ilə Birləşdikdə Fəallaşmış Olurlar.

Xüsusi RNT tərəfindən verilmiş amin turşusunu ifadə edən kodon və ya kodonların tanınması əslində genetik informasiyanın açılmasının (decoding) ikinci pilləsidir. Birinci pillə, uyğun olan amin turşusunun tRNT-yə qoşulması xüsusi ferment *aminoasil-tRNT sintetaza* vasitəsi ilə kataliz olunur. 20 müxtəlif sintetazanın hər biri bir amin turşusunu və *bütün* ona uyğun olan və ya ona doğma olan tRNT-ləri tanıyır. Bu cütləşən fermentlər aminturşusu ilə tRNT molekulunun 3′ sonluğunda olan adenozinin 2′ və ya 3′ sərbəst hidroksil qrupu arasında ATP tələb olunan reaksiya vasitəsi ilə əlaqə yaradır. Bu reaksiya zamanı, amin turşusu yüksək enerjili rabitə ilə tRNT-yə birləşir və belə olan vəziyyətdə o fəallaşmiş olur. Bu rabitənin enerjisi uyğun olaraq amin turşusunun polipeptid zəncirindəki amin turşusuna birləşməsi üçün sərf olunur. Aminoasilləşmə reaksiyasının tarazlığı, sonra ayrılan pirofosfatda olan yüksək enerjili fosfoanhidrid rabitələrinin hidrolizi yolu ilə amin turşularının fəallaşması istiqamətində gedir (bax Şəkil 5-19).

Aminoasil-tRNT sintetaza öz doğma tRNT-lərini əsasən antikodon ilgək və ***akseptor*** (***qəbul edici***) sütun ilə qarşılıqlı əlaqə yaratmaqla tanıyırlar, hərçənd ki, bəzi hallarda, tRNT-nin başqa rayonları ilə olan qarşılıqlı əlaqə də bu tanımaya kömək edir. Bununla belə, quruluşuna görə doğma (cognate) tRNT-yə bənzəyən səhv tRNT-lərin spesifik əsasları səhv tRNT-lərin yüklənməsini ingibirləşdirəcək. Beləliklə, düzgün tRNT-lərin tanınması həm müsbət qarşılıqlı əlaqənin olmasından, həm də mənfi qarşılıqlı əlaqələrin olmamasından asılıdır.



Şəkil 5-21 Yelləncək vəziyyətdə qeyri-standart əsas cütlərinin əmələ gəlməsi. Əsaslar mRNT kodonun üçüncü (və ya yelləncək) vəziyyətində adətən, tez-tez tRNT-nin birinci vəziyyətndə olan (ə ya yelləncək) antikodonla qeyri standart əsas cütləri əmələ gətirir. Yelləncək cütləşmə tRNT-yə imkan verir ki, birdən artıq mRNT kodonunu (*yuxarıda*) tanısın; əksinə desək, o imkan verir ki, kodon birdən artıq müxtəliuf tRNT-lər ilə tanınsın (*aşağıda*), hərçənd ki, hər bir tRNT eyni amin turşusunu gətirəcək. Nəzərə alaq ki, tRNT yelləncək vəziyyətində I (inozin) qalığı ilə üç müxtəlif kodonu oxuya bilir (cütləşə bilir) və tRNT yelləncək vəziyyətdə G və ya U ilə iki kodonu oxuya bilər. Baxmayaraq ki, A əsası nəzəri olaraq antikodonun yelləncək vəziyyətində ola bilir, amma o heç vaxt təbiətdə tapılmamışdır. (Qeld edək ki, bu tRNT-nin sadələşdirilmiş diaqramıdır. tRNT-nin əsil quruluşu Şəkil 5-20b-də təsvir edilmişdir).

Bəzi amin turşuları quruluşuna görə çox yaxın olduqlarından yenə də aminoasil-tRNT sintetaza bəzən səhvlər edir. Amma, bu səhvlər fermentin özü tərəfindən düzəldilir və buna fermentin ***doğruluğu-oxuma*** (***proofreading***) fəallığı deyilir, bu zaman ferment birləşmiş amin turşusunun doğruluğunu yoxlayır. Əgər tRNT-yə səhv amin turşusu birləşmiş olarsa, o zaman birləşmiş sintetaza amin turşusunun tRNT-dən ayrılmasını kataliz edir. Bu həlledici funksiya, tRNT-nin zülal sintez edən maşına düzgün amin turşusunu çatdırmasına zəmanət verr. *E. coli*-də translyasiya zamanı səhvlərin əmələ gəlməsi tezliyinin çox aşağı olması, təxminən hər 50000 kodona 1 səhv həm tRNT-nin tanınmasının dəqiqliyini, həm də aminoasil-tRNT sintetaza vasitəsi ilə ***doğruluğu-oxuma***nın dəqiqliyini göstərir .

5.3 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

mRNT-lərin tRNT-lər Vasitəsi ilə Tapılması

- Genetik informasiya DNT-dən RNT-yə bir-birini qismən örtən, degenrativ (cırlaşan) triplet kodlar şəklində transkripsiya olunur.
- Hər bir amin turşusu bir və ya daha çox üç nukleotid ardıcıllıqlarla (kodonlarla) mRNT-də kodlaşdırılır. Hər kodon bir amin turşusunu tanıyır (təmsil edir), amma amin turşularının çoxu birdən artıq kodonla kodlaşdırılır (bax Cədvəl 5-1).
- Metioninin AUG kodonu ümumi start kodon olub zülal zəncirində amin-sonluqdakı amin turşusunu təyin edir. Üç kodon (UAA, UAG, UGA) stop kodon kimi fəaliyyət göstərərək heç bir amin turşusunu təyin etmir.
- Oxunan çərçivə, mRNT-də start kodondan başlayaraq stop kodona qədər olan kodonların fasiləsiz ardıcıllığı, polipeptid zəncirində amin turşularının xətti ardıcıllığına translyasiya olunur.
- mRNT-də nukleotid ardıcıllığı kodunun zülallarda aminturşu ardıcıllığına açılması tRNT-dən və aminoasil-tRNT sintetazadan asılıdır.
- Bütün tRNT-lər xüsusi amin turşusunun birləşdiyi akseptor (qəbul edici) qol və sonunda üç-əsaslı antikodon ardıcıllığı olan sütun-ilgəyin iştirak etdiyi oxşar üç-ölçülü quruluşa malikdirlər (bax Şəkil 5-20). Antikodon, mRNT-də ona uyğun olan kodonla əsas-cütü əmələ gətirə bilir.
- Qeyri standart qarşılıqlı əlaqələrə görə tRNT birdən artıq mRNT kodonu ilə əsas cütü əmələ gətirə bilir; əksinə, hər hansı bir kodon çoxsaylı tRNT-lərlə əsas cütü əmələ gətirə bilir. Amma hər bir halda, uzunayan polipeptid zəncirinə yalnız düzgün amin turşu keçirilir.
- 20 aminoasil-tRNT sintetazanın hər biri tək bir amin turşusunu tanıyır və onu kovalent rabitə ilə ona doğma olan tRNT ilə birləşdirərək aminoasil-tRNT-ni yaradır (çax Şəkil 5-19). Bu reaksiya amin turşusunu fəallaşdırır və beləliklə də peptidil əlaqələrinin formalaşmasında iştirak edir.

5.4. Zülalların Ribosomlarda Mərhələlərlə Sintezi

Əvvəlki bölmə zülal sintezinin əsas iştirakçılarından ikisini təqdim etmişdir - mRNT və aminoasilləşmiş tRNT. Biz burada ilkin olaraq, bütün üç komponentin birlikdə ribosomlarda polipeptid zəncirin əmələ gəlməsinə gətirib çıxaran biokimyəvi prosesləri necə aparmasına ətraflı nəzər salmazdan əvvəl, zülal sintezinin üçüncü əsas iştirakçısı - tərkibində rRNT olan ribosomu təsvir edirik. Transkripsiyada olduğu kimi, translyasiyanın kompleks prosesi üç mərhələyə - inisiasiya, elonqasiya və terminasiya mərhələlərinə bölünə bilir və biz bunlara ardıcıllıqla nəzər salırıq. Biz diqqətimizi eukariotlarda translyasiyanın izahına cəmləmişik, amma translyasiyanın mexanizmi fundamental olaraq bütün hüceyrələrdə eynidir.

Ribosomlar Zülal Sintez Edən Maşındır.

Əgər mRNT-nin translyasiyasında iştirak edən çox komponentlər sərbəst məhlulda qarşılıqlı təsirdə olurlarsa, onların bir yerə gəlmə ehtimalı o qədər zəif olardı ki, o zaman aminturşularının polimerləşməsi sürəti çox aşağı olardı. Ribosomlarda mRNT-nin və fərdi aminoasil-tRNT-nin birləşməsi ilə translyasiyanın səmərəliliyi çox artır. Hüceyrənin ən zəngin RNT-zülal kompleksi olan ribosom polipeptidin elonqasiyasını 3-dən 5-ə qədər amin turşusu saniyə sürəti ilə birləşdirməklə aparır. Ona görə də 100-200 amin turşusundan ibarət ilan kiçik zülallar bir dəqiqə və ya daha qısa müddətdə sintez olunur. Digər tərəfdən böyük zülalların, məsələn əzələ toxumasında tapılmış və 30000 aminturşu qalığından ibarət olan titin kimi məlum olan zülalların sintezi 2-3 saat çəkir. Bu cürə prosesi yerinə yetirən hüceyrə "maşını" dəqiq və qırılmaz (davamlı) olmalıdır.

Elektrom mikroskopunun köməyi ilə ribosomlar ilk dəfə hüceyrədə kiçik, diskret, RNT-ilə zəngin olan, və çoxlu miqdarda zülal ifraz edən hissəciklər kimi açılmışdır. Amma onların zülal sintezindəki rolu kifayət qədər təmizlənmiş robosom preparatı əldə olunana qədər tanınmamışdır. İn vitro radio-nişanlanmış təcrübələr zamanı belə preparatlar göstərdi ki, radioaktiv amin turşuları ilkin olaraq, uzunamaqda olan polipeptid zəncirində yığılır və bu zəncir tamamlanana qədər ribosomlarla assosasiyada olurlar.

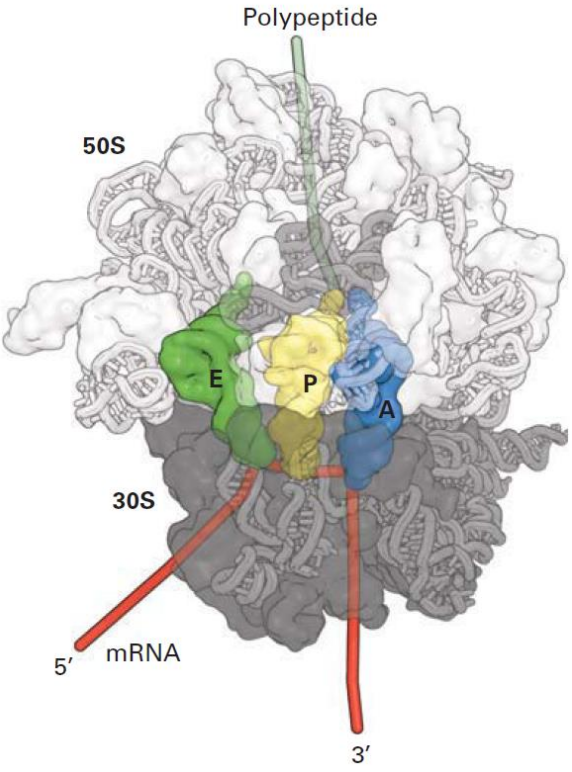
Cədvəl 5-3 Ribosom komponentləri

Ümumi özək	***E. coli***	***S. cerevisiae***	**Human**
2.0 MDa	2.3 MDa	3.3 MDa	4.3 MDa
34 zülal	54 zülal	79 zülal	80 zülal
3 rRNT	3 rRNT	4 rRNT	4 rRNT
Böyük subvahid			
	50S	60S	60S
19 zülal	33 zülal	46 zülal	47 zülal
23S rRNT: 2843 əsas	23S rRNT: 2904 əsas	25S rRNT: 3396 əsas*	28S rRNT: 5034 əsas*
		5.8S rRNT: 158 əsas*	5.8S rRNT: 156 əsas*
5S rRNT: 121 əsas	5S rRNT: 121 əsas	5S rRNT: 121 əsas	5S rRNT: 121 əsas
Kiçik subvahid			
	30S	40S	40S
19 zülal	33 zülal	46 zülal	47 zülal
16S rRNT: 1458 əsas	16S rRNT: 1542 əsas	18S rRNT: 1800 əsas	18S rRNT: 1870 əsas

*5.8S rRNT eukariotlarda 25S və ya 28S rRNT-də əsas cütləri əmələ gətirirlər.
Mənbə: Verilənlər G. Yusupov and M. Yusupov, *Ann. Rev. Biochem.*, 2014, **83:**467.

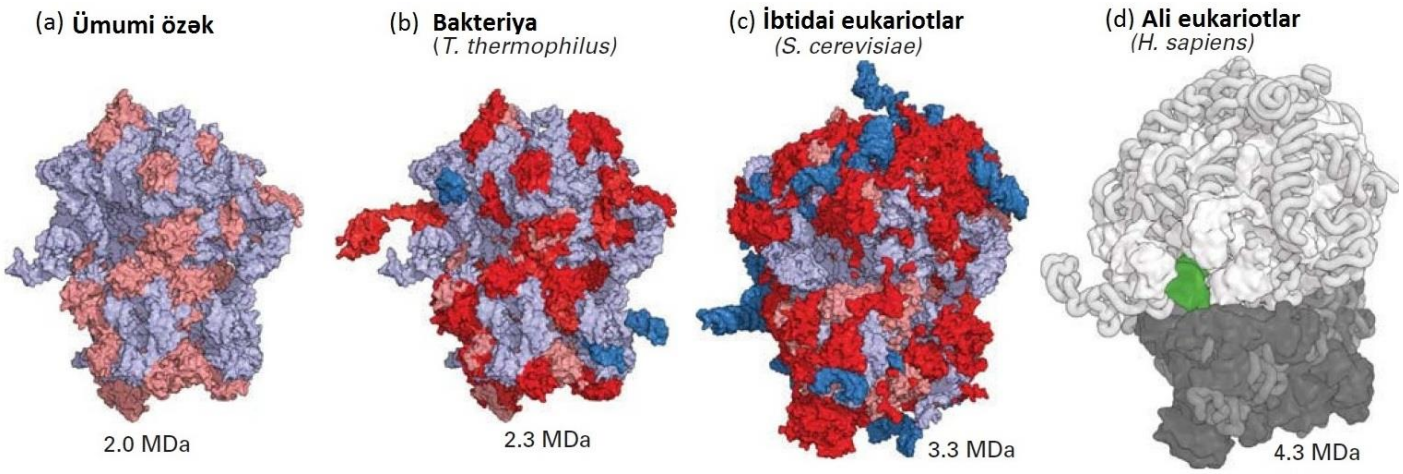
Baxmayaraq ki, bakteriya, arxea və eukariotların ribosomları arasında fərqlər var, amma bütün növlərin orqanizmlərində mövcud olan ribosomlar arasındakı böyük quruluş və funksional oxşarlıqlarına görə demək olar ki, bütün canlı hüceyrələr təkamül baxımından eyni mənşədən yaranmışlar. Ribosomlar üç (bakteriya və arxealarda) və ya dörd (eukariotlarda) müxtəlif rRNT molekulundan və 80 qədər çox sayda müxtəlif zülallardan ibarət olan böyük və kiçik subvahidlərdən təşkil olunmuşdur (Şəkil 5-22 və Cədvəl 5-3). Ribosomun subvahidləri və rRNT molekulları qəbul olunmuş ümumi vahidlə - svedberq vahidi (S) ilə göstərilir, bu makromolekulun ölçüsündən asılı olaraq standart şəraitdə sentrifuqada, sedimentasiya dərəcəsini, mahiyyətcə ölçüsünün loqarifmik miqyasını göstərir. Kiçik ribosom subvahidi yalnız bir rRNT molekuluna malikdir və *kiçik rRNT* adlandırılır. Böyük subvahid ***böyük rRNT*** molekulundan və bir ***5S rRNT*** molekulundan, onurğalılarda isə əlavə bir 5.8S rRNT molekulundan təşkil olunurdu. rRNT molekullarının uzunluğu, hər subvahiddə zülalların miqdarı və uyğun olaraq subvahidlərin ölçüsü bakterial və eukariot hüceyrələrdə fərqlənirlər (bax Cədvəl 5-3). Tam yığılmış ribosomlar bakteriyalarda 70S, onurğalılarda isə 80S olur.

Artıq bir neçə min orqanizmdən ayrılmış böyük və kiçik rRNT-lərin nukleotid ardıcıllıqları məlumdur. Bu rRNT-lərin ilkin nukleotid ardıcıllıqları nəzərə çarpacaq dərəcədə çox fərqlənsələr də, hər bir tipə aid olan rRNT-lərin eyni hissəsi (rayonu) nəzəri olaraq əsas cütü ilə əmələ gələn baş sancaqları, sütun ilgəkləri və ilgək-ilgək qarşılıqlı əlaqələrini (bax Şəkil 5-9) formalaşdırırlar, bu da bütün orqanizmlərdə rRNT-lərin oxşar üç-ölçülü quruluşlarının yaranmasına səbəb olur. Bakterial və maya ribosomlarının üç-ölçülü quruluşları (bax Şəkil 5-23) və arxeaların ribosomlarının böyük subvahidinin quruluşu rentgen-kristalloqrafiya yolu ilə müəyyən olunmuşdur. İnsan və bitki ribosomlarının quruluşu (bax Şəkil 5-23) krioelektron mikroskopu ilə təyin edilmişdir. mRNT-lərin və tRNT-lərin birləşdiyi və peptid əlaqələrin yaranmasının kataliz olunduğu ümumi özəkdə (mərkəzdə) rRNT-lərin quruluşu həyatın hər üç domenində çox oxşardır. Amma arxea ribosomlarındakı rRNT-lər və zülallar prokariotlarınkından daha çox eukariotlarınkına oxşardırlar, bu da onların sonrakı ümumi bir əcdaddan olan divergensiyasını əks etdirir (bax Şəkil 1-1). Çoxsaylı ribosomal zülalların əksər hissəsi rRNT-lərdən çox kiçikdirlər və ribosomun səthi ilə assosasiyadadırlar. Baxmayaraq ki, ribosomlarda zülal molekullarının sayı RNT molekullarının sayından çox-çox artıqdır, amma RNT bakterial ribosomun kütləsinin 60 faizini, insan ribosomu kütləsinin isə 50 faizə qədərini təşkil edir. Eukariot ribosomları ümumiyyətlə bakterial ribosomlara oxşayır, amma eukariot-spesifik RNT seqmentlərinin ümumi RNT mərkəzlərinə insersiyası və eləcə də böyük miqdarda zülalların olması ilə onlardan çox böyükdürlər (bax Şəkil 5-23 və Cədvəl 5-3). Zülal sintezinin əsas aspektləri, belə hesab edilir ki, hər üç domenin nümayəndələri arasında çox oxşardır, hərçənd ki, irəlidə müzakirə edəcəyimiz kimi eukariotlarda translyasiyanın inisiasiyası daha mürəkkəbdir və əlavə tənzimləmə mexanizmlərinə məruz qalır.



ŞƏKİL 5-22 Bakterial ribosomun quruluşu. *T. thermophilus* ribosomunun modelinə böyük (50) və kiçik (30) subvahidlər arası interfeys boyu baxılmışdır. Kiçik subvahiddə 16S rRNT və zülallar tünd boz rəngdə göstərilir. RNT tyub (şlanq) modelində çəkilmişdir və zülal səthi göstərilir, böyük subvahiddə 23S rRNT və zülallar açıq boz rəngdədirlər, 5S rRNT isə aralıq (orta) boz rəngdədir. Ribosomun səthi tRNT-lərin A, P və E saytlarında mövqeyini göstərmək üçün qismən şəffaf göstərilir. Qeyd edək ki, ribosomal zülallar əsasən ribosomun səthində yerləşirlər. [Verilənlər A. Korostelev et al., 2006, *Cell* **126**:1065-1077, PDB ID 4v4i-dən.]

Ribosomların yüksək rezolyusiyalı quruluşu, antibiotiklərin məməlilərin ribosomlarına təsir etmədən bakteriyal zülal sintezini ingibirləşdirməsi mexanizminə yeni ideyalar gətirdi. Bu ideyalar yeni antibiotiklərin dizan olunması və sintezi üçün əhəmiyyətli ipucuları (zəmn) verdı. Belə tədqiqatlar hazırda mövcüd olan antibiotiklərə davamlı bakteriyaların yaranmasına qarşı ümüdsüz dərəcədə lazım idi, xüsusən də antibiotikə-davamlı bakteriyaların müsbət (pozitiv) seçimi qarşısında olan xəstəxanalarda.



ŞƏKİL 5-23 Həyatın bütün domenlərində və bakterial, maya və insan ribosomlarında ribosomların mərkəzi özəyinin ümumi quruluşunun müqayisəsi. (a) Ümumi özək quruluşda RNT açıq mavi rəngdə göstərilir, bütün ribosomlara ümumi olan zülal domenləri isə çəhrayı rəngdə göstərilir. Ümumi özək quruluşun əlavə edilməsi RNT üçün tünd göy rəngdə göstərilir *T. thermophilus* (a) və *S. cerevisiae* ribosomunda zülallar isə qırmızı rəngdə göstərilir. (d) İnsanın krioelektron mikroskopundan alınmış ribosom quruluşu. E saytında görünən tRNT yaşıl rəngdə göstərilir. [(a, b, c) üçün verilənlər G. Yusupova and M. Yusupov, 2014, *Annu. Rev. Biochem.* **83**:467-dən; (d) üçün verilənlər H. Khatter et al., 2015, *Nature* **520**:640; PDB ID 4ug0-dən.]

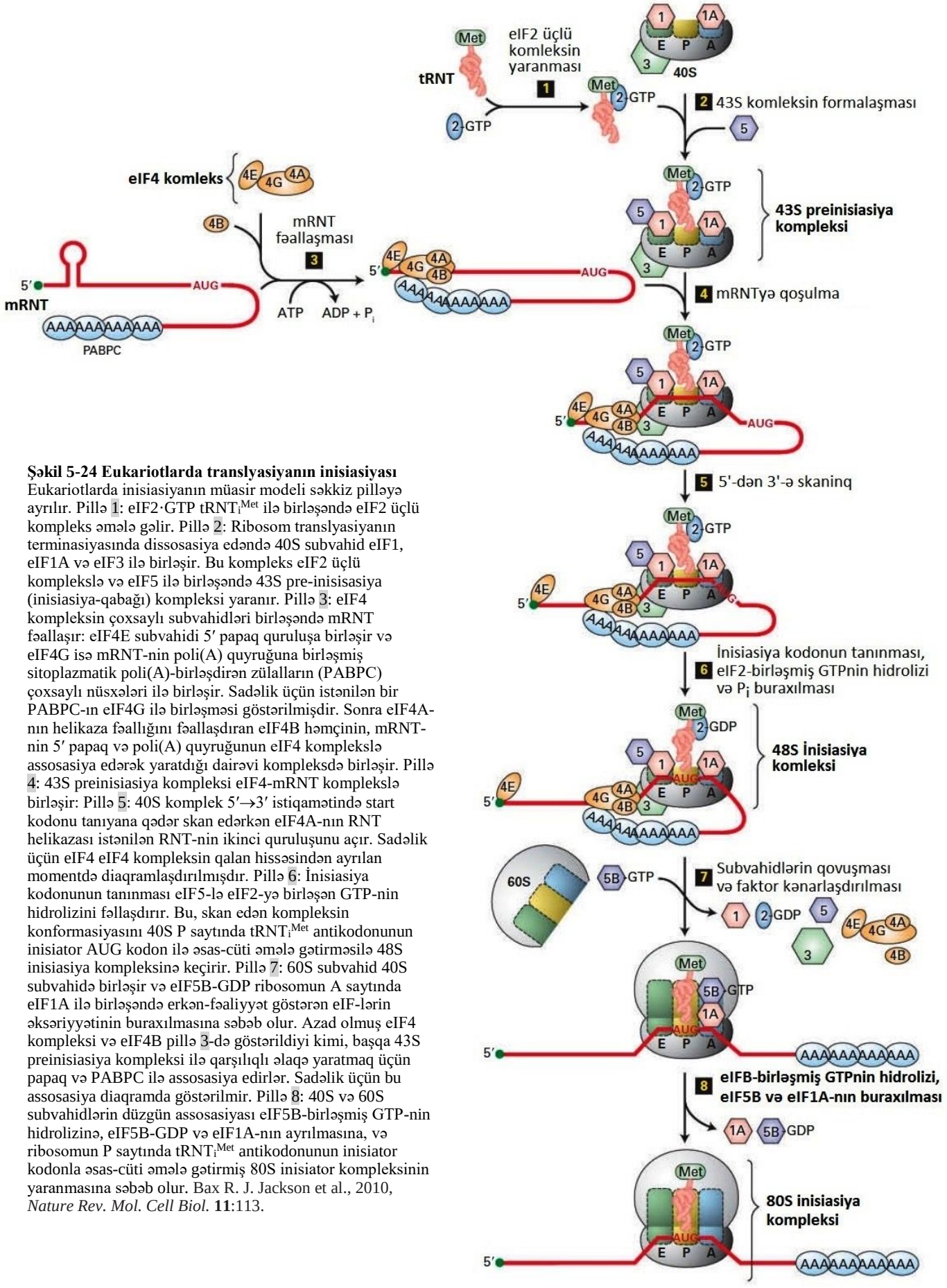
Metionil-tRNT$_i^{Met}$ AUG Start Kodonunu Tanıyır

Yuxarıda (əvəllər) qeyd olunduğu kimi, metionin üçün AUG kodonu mRNT-lərin əksəriyyətində start kodon funksiyasını yerinə yetirir. Translyasiyanın inisiasiyasının həlledici momenti start kodonda zülalın sintezinin başlaması və bununla da mövcud olan mRNT üçün düzgün açıq oxunan çərçivənin yaranmasıdır. Həm prokariotlar həm də eukariotlar iki müxtəlif metionin tRNT-lərinə malikdirlər: tRNT$_i^{Met}$ zülal sintezini insiasiya edə bilir, və tRNT^{Met} isə metionini yalnız uzunamaqda olan zəncirə birləşdirə bilir. Eyni amonoasil-tRNT sintetaza (MetRS) hər iki tRNT-nı metionin ilə yükləyir. Amma, polipeptid zəncirin sintezini başlamaq üçün yalnız Met-tRNT$_i^{Met}$ (başqa sözlə fəallaşmış metionin yüklənən tRNT$_i^{Met}$) kiçik ribosomal subvahiddə müvafiq olan sayta, ***P saytına*** birləşə bilir. Mütəmadi Met-tRNT^{Met} və bütün yüklənmiş başqa tRNT-lər, aşağıda izah olunduğu kimi, ribosomun yalnız ***A saytına*** birləşə bilirlər. tRNT-lər onlara kovalent rabitə ilə birləşmiş şəkilkdə gətirdikləri amin turşusunu uzunamaqda olan polipeptid zəncirinə ötürdükdən sonra çıxışa, daha doğrusu ***E saytına*** girirlər.

Eukariotlarda Translyasiyanın Inisiasiyası Adətən mRNT-nin 5′ Sonluğuna Yaxın Olan İlk AUG Kodonunda Baş Verir.

Translyasiyanın birinci mərhələsi zamanı böyük və kiçik ribosomal subvahidlər ribosomun P saytında start kodonda düzgün mövqe tutmuş Met-tRNT$_i^{Met}$ olan mRNT ətrafında yığılırlar. Eukariotlarda bu proses eukariotik translyasiyanın inisiasiyası faktorları adlandırılan (eIFs) xüsusi zülallar dəsti vasitəsi ilə həyata keçirilir. Hər bir fərdi komponent kompleksə qoşulduqda o xüsusi eIF-lərlə qarşılıqlı əlaqə vasitəsilə yönəldilir. Bu insiasiya faktorlarının bir neçəsi GTP birləşdirirlər, və GTP-nin GDP-yə hidroliz olunması "proofreadig" (doğruluğun yoxlanması) funksiyasının işə düşməsini həyta keçirirlər, bu yalnız mövcud Pillənin doğru olduğu halda növbəti Pillənin atılmasına imkan verir. GTP hidroliz olunmazdan öncə kompleks qeyri stabil olur, komponentlərin dissosasiyasına və kompleksin formalaşması zamanı tam düzgün kompleks yığılana kimi ikinci cəhdə imkan yaradır, nəticədə GTP-nin hidrolizi və müvafiq kompleksin stabilləşməsi baş verir.

Son bir neçə ildə onurğalılarda translyasiyanın inisiasiyasının başa düşülməsi istiqamətində əhəmiyyətli irəliləyişlər olmuşdur. Onurğalılarda translyasiyanın inisiasiyasının indiki modeli Şəkil 5-24-də təsvir edilmişdir. Böyük və kiçik ribosom subvahidləri translyasiyanın başa çatmış dövrəsində azad olur və inisiasiya faktorları eIF1, eIF1A və eIF3 ilə birləşməklə bir birindən ayrı vəziyyətdə olurlar (Şəkil 5-24, *yuxarıda*). Translyasiyanın inisiasiyasının birinci Pilləsi ***43S preinisiasiya kompleksi***nin formalaşmasıdır. Bu preinisiasiya kompleksi 40S kiçik subvahid eIF1, eIF1A və eIF3 ilə birlikdə eIF5-lə assosasiya etməklə əmələ gəlir, üçlü (üç-hissə) kompleks isə Met-tRNT$_i^{Met}$-dən və GTP-yə birləşmiş eIF2-dən ibarətdir (Şəkil 5-24, pillə 1 və 2). eIF2 inisiasiya faktoru GTP və ya GDP birləşmiş formalara keçə bilir, o yalnız GTP birləşmiş vəziyyətində olarkən Met-tRNT$_i^{Met}$-i özünə birləşdirə bilir. Hüceyrə zülal sintezini GDP birləşmiş eIF2də serin qalıqlarını fosforlaşdırmaqla ingibirləşdirə bilir, fosforlaşmış kompleks GDP-ni GTP ilə əvəz etmək qabliyyətini itirir, ona görə də Met-tRNT$_i^{Met}$-i özünə birləşdirə bilmir, beləliklə zülalın sintezi baş vermir.



Şəkil 5-24 Eukariotlarda translyasiyanın inisiasiyası
Eukariotlarda inisiasiyanın müasir modeli səkkiz pilləyə ayrılır. Pillə 1: eIF2·GTP $tRNT_i^{Met}$ ilə birləşəndə eIF2 üçlü kompleks əmələ gəlir. Pillə 2: Ribosom translyasiyanın terminasiyasında dissosasiya edəndə 40S subvahid eIF1, eIF1A və eIF3 ilə birləşir. Bu kompleks eIF2 üçlü kompleksə və eIF5 ilə birləşəndə 43S pre-inisisasiya (inisiasiya-qabağı) kompleksi yaranır. Pillə 3: eIF4 kompleksin çoxsaylı subvahidləri birləşəndə mRNT fəallaşır: eIF4E subvahidi 5′ papaq quruluşa birləşir və eIF4G isə mRNT-nin poli(A) quyruğuna birləşmiş sitoplazmatik poli(A)-birləşdirən zülalların (PABPC) çoxsaylı nüsxələri ilə birləşir. Sadəlik üçün istənilən bir PABPC-ın eIF4G ilə birləşməsi göstərilmişdir. Sonra eIF4A-nın helikaza fəallığını fəallaşdıran eIF4B həmçinin, mRNT-nin 5′ papaq və poli(A) quyruğunun eIF4 kompleksə assosasiya edərək yaratdığı dairəvi kompleksdə birləşir. Pillə 4: 43S preinisiasiya kompleksi eIF4-mRNT kompleksə birləşir: Pillə 5: 40S komplek 5′→3′ istiqamətində start kodonu tanıyana qədər skan edərkən eIF4A-nın RNT helikazası istənilən RNT-nin ikinci quruluşunu açır. Sadəlik üçün eIF4 eIF4 kompleksin qalan hissəsindən ayrılan momentdə diaqramlaşdırılmışdır. Pillə 6: İnisiasiya kodonunun tanınması eIF5-lə eIF2-yə birləşən GTP-nin hidrolizini fəllaşdırır. Bu, skan edən kompleksin konformasiyasını 40S P saytında $tRNT_i^{Met}$ antikodonunun inisiator AUG kodon ilə əsas-cüti əmələ gətirməsilə 48S inisiasiya kompleksinə keçirir. Pillə 7: 60S subvahid 40S subvahidə birləşir və eIF5B-GDP ribosomun A saytında eIF1A ilə birləşəndə erkən-fəaliyyət göstərən eIF-lərin əksəriyyətinin buraxılmasına səbəb olur. Azad olmuş eIF4 kompleksi və eIF4B pillə 3-də göstərildiyi kimi, başqa 43S preinisiasiya kompleksi ilə qarşılıqlı əlaqə yaratmaq üçün papaq və PABPC ilə assosasiya edirlər. Sadəlik üçün bu assosasiya diaqramda göstərilmir. Pillə 8: 40S və 60S subvahidlərin düzgün assosasiyası eIF5B-birləşmiş GTP-nin hidrolizinə, eIF5B-GDP və eIF1A-nın ayrılmasına, və ribosomun P saytında $tRNT_i^{Met}$ antikodonunun inisiator kodonla əsas-cüti əmələ gətirmiş 80S inisiator kompleksinin yaranmasına səbəb olur. Bax R. J. Jackson et al., 2010, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **11**:113.

Translyasiya olunan mRNT eIF4 kompleksinin çoxsaylı müxtəlif subvahidləri ilə birləşir, bu subvahidlər mRNT-də həm 5′-papaq quruluş ilə həm də mRNT-nin poli(A) quyruğuna birləşmiş çox-nüsxəli poli(A)-birləşdirən zülallarla (PABP) qarşılıqlı əlaqəyə girir. Hər iki qarşılıqlı əlaqə əksər mRNT-lərin translyasiyası üçün tələb olunur. Bu bağlanma dairəvi kompleksin formalaşması ilə əmələ gəlir (Şəkil 5-24, pillə 3). eIF4 papaq-birləşdirən kompleks bir neçə müxtəlif funksiyalı subvahiddən təşkil olunmuşdur. eIF4E subvahid mRNT-də 5′-papaq-quruluşa birləşir (bax Şəkil 5-14). Daha böyük olan eIF4G subvahid mRNT-nin poli(A) quyruğuna birləşmiş bir sıra PABPC zülallar ilə kooerativ birləşir, həmçinin başqa eIF4 subvahidlərin birləşdiyi skafoldu yaradır. Sonra mRNT-eIF4 kompleks eIF4G və eIF3 ilə əlaqə yaratmaqla pre-inisiasiya kompleksi ilə assosasiya edir (pillə 4).

Sonra, inisiasiya kompleksi assosasiyada olduğu mRNT boyunca sürünür və ya onu ***skan edir,*** RNT-nin ikinci quruluşunu açmaq üçün eIF4B ilə stimullaşan eIFA helikaza fəallığı kimi ATP hidrolizinin enerjisindən istifadə edir (pillə 5). $tRNT_i^{Met}$ antikodon əksər eukariot mRNT-lərin çoxunda 5′-sonluqdan aşağıya gediş istiqamətində rast gəlinən birinci AUG start kodonu tanıyan kimi skan olunma dayanır. Start kodonun tanınması eIF2 ilə birləşmiş GTP-nin hidrolizinə səbəb olur, geriyə dönən bu mərhələ skan olunmanın davam etməsinə mane olur, nəticədə ***48S inisiasiya kompleksi*** formalaşır (pillə 6). Düzgün inisiasiya kodonuna bu cürə bağlılıq eIF2-GTP-aza fəallaşdıran zülal (GAP, bax Şəkil 3-34) eIF5 vasitəsi ilə asanlaşır. AUG inisiasiya kodonun seçilməsi, onu tapan Marilyn Kozakın şərəfinə ***Kozak ardıcıllığı*** adlandırılan, yaxınlıqdakı nukleotidlərlə: (5′)ACCAUGG(3′) asanlaşır. AUG-dən öncə gələn A və onun dalınca gələn G translyasiyanın inisiasiyasının effektivliyinə təsir edən ən əhəmiyyətli nukleotidlərdi.

Böyük subvahidin (60S) kiçik subvahidlə (40S) GTP ilə birləşmiş eIF5B vasitəsilə baş verən assosasiyası çox inisiasiya faktorlarının yerinin dəyişilməsi ilə nəticələnir (pillə 7). Ribosom subvahidləri arasında düzgün assosasiya eIF5B birləşmiş GTP-nin GDP-yə hidrolizinə və eIF5B-GDP ilə eIF1A-nın buraxılmasına səbəb olur (pillə 8) və ***80S inisiasiya kompleksinin*** formalaşması tamamlanır. Ribosom subvahidlərinin birləşməsi reaksiyasının eIF5B vasitəsi ilə GTP hidrolizinə cütləşməsi inisiasiya prosesinin davam etməsinə o vaxt imkan verir ki, subvahidlər arasında qarşılıqlı əlaqə düzgün baş versin. O həmçinin bu mərhələni elə geriyə dönməz şəkildə edir ki, ribosom subvahidləri mövcud mRNT-nin translyasiyası başa çatana qədər və yeni polipeptid zəncir sintez olunub qurtarana qədər dissosasiya etmirlər.

Ekariotik zülal-sintez edən maşın hüceyrə mRNT-lərinin çoxunda translyasiyanı, yuxarıda təsvir olunduğu kimi, 5′-papaq sonluğunun təxminən 100 nukleotid hüdudunda başlayır. Amma bəzi hüceyrələrdə mRNT-lər 5′-sonluqdan aşağıya istiqamətdə yerləşən **daxili ribosom qəbulu saytına** (IRES) malikdirlər. Belə güman olunur ki, hüceyrədə IRES-lər, eIF4A və eIF4G kompleksi ilə qarşılıqlı əlaqədə olan RNT quruluşu komplekslərini yaradırlar, hansı ki, bunlar da sonra eIF1 və eIF1A vasitəsi ilə 40S subvahidə birləşən eIF3 ilə assosasiya edirlər. Bu cürə toplanmış quruluş vahidi (assembly) sonra eIF2 üçlü quruluş kompleksi ilə birləşir və birbaşa qonşuluqda olan AUG kodonu üzərində inisiasiya kompleksini yaradır. Bundan əlavə, 5′-papağı olmayan bəzi müsbət (pozitiv) düzülmüş virus RNT-lərinin translyasiyası virus IRES ardıcıllığında inisiasiya olunur. Bunlar, inisuasiya üçün neçə ədəd standart eIF-in tələb olunmasından asılı olaraq müxtəlif siniflərə bölünürlər. Məsələn kriket paraliçi viruslarında ~200-nukleotid-uzunluqda IRES 40S ribosomla birbaşa qarşılıqlı əlaqə yaradan kompleks quruluş şəkilində bükülür və eIF-lərin heç birinin və ya hətta inisiator $Met\text{-}tRNT_i^{Met}$ iştirakı olmadan belə inisasiyanı həyata keçirir.

Bakteriyalarda kiçik ribosomal subvahidin inisiasiya saytına birləşməsi fərqli mexanizmlə baş verir, bu mexanizm operonlardan transkripsiya olunan polisistron mRNT-lərin daxili saytlarında inisiasiyaya imkan verir. Bakterial mRNT-lərdə, kiçik rRNT-lərin 3′-sonluğuna komplementar olan ~6 əsaslı ardıcıllıq AUG kodondan 4-7 nukleotid qabaqda yerləşir. mRNT-də bu ardıcıllığı açanın şərəfinə Şayni-Dalqarno (Shine-Dalgarno) ardıcıllığı adlandırılan, bu ardıcıllıq arasında əsas cütləri əmələ gəlir və bu zaman kiçik rRNT molekulu kiçik ribosom subvahidini inisiasiya üçün düzgün (doğru) mövqedə yerləşdirir. Sonra eIF1A, eIF2, eIF3 və $f\text{-}Met\text{-}tRNT_i^{Met}$ uyğun olan inisasiya faktorları kiçik subvahidlə birləşir (assosasiya edir) və onun dalınca böyük subvahid birləşərək tam bakterial ribosomu əmələ gətirir.

Zəncirin Elonqasiyası Zamanı Gələn Hər Bir Aminoasil-tRNT Üç Ribosomal Saytdan Keçir

Düzgün yerləşmiş $Met\text{-}tRNT_i^{Met}$ kompleks artıq mRNT-də oxunan çərçivənin translyasiyasına uyğun olaraq amin turşularının pillə-pillə əlavə olunmasına başlamaq üçün hazırdır. İnisiasiyada olduğu kimi, **translyasiyanın elonqasiyası faktorları** (EFlər) adlandırılan xüsusi zülallar dəsti zəncirin elonqasiyası prosesini həyata keçirmək üçün tələb olunurlar. Elonqasiya prosesinin əsas mərhələsi növbəti kodona komplementar olan tRNT vasitəsi ilə uyğun olan aminoasil-tRNT-nin daxil olması, peptid əlaqələrinin formalaşması və mRNT boyunca ribosomun hər dəfə bir kodon keçməsi və ya ***translokasiyasıdır***.

Artıq qeyd edildiyi kimi, translyasiyanın inisiasiyasının başa çatması zamanı $Met\text{-}tRNT_i^{Met}$ yığılmış 80S ribosomun P saytına birləşir (Şəkil 5-25, *yuxarıda*). Ribosomun bu rayonu ona görə P saytı adlanır ki, tRNT-nin kimyəvi olaraq birləşdiyi uzunamaqda olan polipeptid zəncirə burada yerləşir. İkinci aminoasil-tRNT ribosoma EF1α•GTP ilə birləşmiş üçqat komleks şəkilində gətirilir və A saytına birləşir, bu ona görə A saytı adlandırılır ki, buraya ***a***minosilləşmiş tRNT birləşir (pillə 1). Müxtəlif aminoasil-tRNT-lərlə birləşən EF1α•GTP A saytı daxilinə diffuziya edir, amma, translyasiyanın növbəti mərhələsi o vaxt davam edir ki, tRNT-nin antikodonu kodlaşdırıcı rayonun növbəti kodonu ilə əsas cütü əmələ gətirə bilsin. Bu düzgün baş verdikdə EF1α·GTP-də olan GTP hidroliz olunur. GTP-nin hidrolizi ilə EF1α konformasiya dəyişikliyinə məruz qalır, nəticədə EF1α·GDP kompleks azad olur və aminoasil-tRNT sıx şəkildə A saytına birləşir (pillə 2). Belə konformasiya dəyişikliyi A saytında tRNT-nin aminoasilləşmiş 3′ sonluğunu P saytında $Met\text{-}tRNT_i^{Met}$-in 3′ sonluğuna çox yaxın mövqedə yerləşdirir. Əgər yeni daxil olmuş aminoasil-tRNT-nin antikodonu A saytında kodonla əsas cütü əmələ gətirə bilmirsə o zaman GTP-nin hidrolizi və onun ardınca sıx birləşmə baş tutmur. Bu halda üçqat quruluş diffuziya edib uzaqlaşır və A sayt boş qalır, o da öz növbəsində, düzgün əsas cütünü əmələ gətirən tRNT birləşənə qədər başqa aminoasil-tRNT-EF1α·GTP kompleksləri

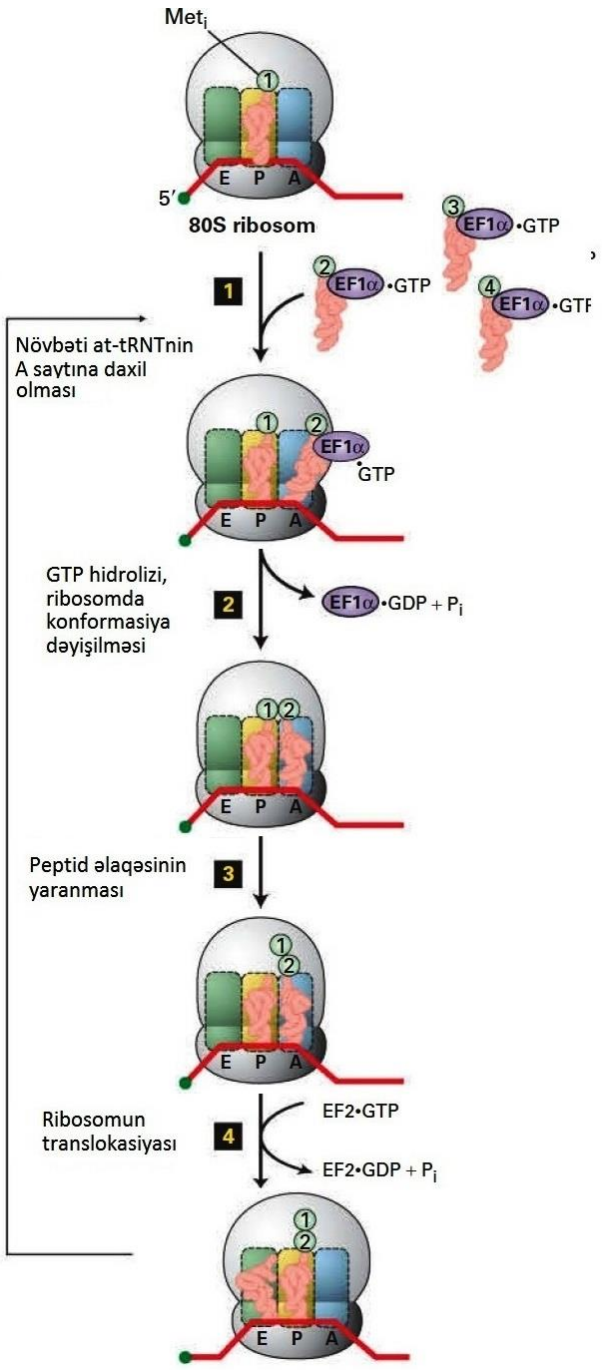
ilə assosasiya edə bilir. Beləliklə, GTPnin EF1α ilə hidrolizi başqa bir ***doğruluğun-oxuması*** (***proofreading***) mərhələsi kimi imkan yaradır ki, zülal sintezi yalnız doğuru aminoasil-tRNT A saytına birləşən zaman davam etsin. Bu fenomen zülal sintezinin dəqiqliyinə imkan yaradır.

Met-$tRNT_i^{Met}$-in P saytında inisiasiya etdiyi və ikinci aminoasil-tRNT-nin A saytına sıx şəkildə birləşdiyi halda, ikinci amin turşusunun α-amin qrupu inisiator-tRNT-də olan "fəallaşmış" (efir əlaqəli) metioninlə reaksiyaya girir və peptid əlaqəsini əmələ gətirir (Şəkil 5-25, pillə 3; bax Şəkil 5-17). Bu ***peptidiltransferaza reaksiyası*** böyük rRNT tərəfindən kataliz olunur və bu zaman qarşılıqlı əlaqədə olan atomlar dəqiqliklə istiqamətləndirilərək reaksiyanın gedişinə imkan yaradılır. P saytında olan peptidil tRNT-dəki terminal A-nın 2′-hidroksili də katalizdə iştirak edir. Bakteriyalarda böyük rRNT-nin katalitik qabliyyəti böyük ribosomal subvahiddən zülalların böyük əksəriyyətinin ehtiyatla uzaqlaşdırılması ilə sübut olunmuşdur. Təxminən təmiz hala qədər çatdırılmış bakterial 23S RNT aminoasil-tRNT və peptidil-tRNT analoqları arasında peptidiltransferaza reaksiyasını kataliz edə bilmişdir. Daha sonra, zülal sintezində böyük rRNT-nin katalitik rolunu təsdiq edən dəlillər yüksək imkanlı (resolution) kristalloqrafik tədqiqatlardan alınmışdır, və göstərilmişdir ki, bakterial böyük subvahidin kristal quruluşunda peptidil əlaqələrinin sintez olunduğu nahiyədə heç bir zülal durmur.

Peptid əlaqəsinin sintezinin ardınca, ribosom mRNT boyunca, bir kodona bərabər məsafədə yerini dəyişir (translokasiya edir). Bu translokasiya pilləsi eukariotik EF2·GTP-də GTP-nin hidrolizi ilə göstərilir. Düzgün yerdəyişmə baş verdikdən sonra, birləşmiş GTP hidroliz olunur, bu ribosomun RNT boynca düzgün olmayan istiqamətdə və ya düzgün olmayan nukleotid sayında yerdəyişmələrinə mane olan geriyə dönməyən başqa bir prosesdir. Ribosomda düzgün yerdəyişmənin müşayət etdiyi və nəticədə EF2 vasitəsi ilə GTP hidroliz olunduğu konformasiya dəyişikliklərinin nəticəsi kimi, $tRNT_i^{Met}$, indi onun fəallaşmış metionini olmadan ribosomda E (çıxış) saytına keçir; uyğun olaraq, indi kovalent rabitə ilə dipeptidə (peptidil-tRNT) birləşmiş ikinci tRNT P saytına keçir (Şəkil 5-25, pillə 4). Beləliklə, translokasiya ribosomun konformasiyasını A saytının açıq olduğu və EF1α·GTP ilə kompleksdə olan başqa bir aminoasilləşmiş tRNT-ni qəbul edə bilmək vəziyyətinə qaytarır və zəncirin elonqasiyasının başqa bir tsiklini başlayır.

Şəkil 5-25-də göstərilmiş elonqasiya tsiklinin təkrarlanması hər dəfə bir amin turşusunu mRNT ardıcıllığında göstərildiyi kimi stop kodona çatana qədər uzunamaqda olan polipettid zəncirinin C-sonluğuna, əlavə edir. Sonrakı tsikllərdə pillə 2-də baş verən konformasiya dəyişikliyi asilsizləşmiş tRNT-ni E saytından çıxarır. Yeni sintez olunmuş polipetid zəncir uzunayan kimi o, böyük ribosomal subvahiddə, onun kiçik ribosomal subvahidlə qarşılıqlı əlaqədə olduğu nahiyənin əks tərəfində yerləşən tuneldən düzülərək keçir (Şəkil 5-22, 5-26).

Ribosom olmayan halda, A və P saytlarında tRNT antikodonları ilə mRNT kodonları arasında üç-əsas-cütlü RNT-RNT hibridi stabil olmur, fizioloji şəraitin təsiri altında stabil olmaq üçün ayrı-ayrı RNT molekulları arasındakı RNT-RNT dupleksləri kifayət qədər uzun müddətli olmalıdır. Amma, böyük və kiçik subvahidlər arasında çoxsaylı qarşılıqlı əlaqələr



Şəkil 5-25 Eukariotlarda zəncirin elonqasiyası. 80S ribosom $tRNT_i^{Met}$ ilə ribosomun P saytında toplandıqdan sonra (*yuxarıda*), mRNT ilə kodlaşdırılan ikinci amin turşusunu (**at$_2$**) gətirən üçlü kompleks A saytına birləşir (pillə 1). Ribosomda, EF1α·GTP-dəki GTP-nin hidrolizi ilə induksiya olunan konformasiya dəyişilməsinin ardınca (pillə 2) böyük rRNT **Met** və **at$_2$** arasında (pillə 3) peptid əlaqəsinin formalaşmasını kataliz edir. EF2·GTP-də GTP-nin hidrolizi ribosomda başqa konformasiya dəyişilməsini əmələ gətirir, nəticədə ribosom mRNT boyunca bir kodon yerini dəyişir və asilsizləşmiş $tRNT_i^{Met}$ yerini dəyişib E saytına və peptid birləşmiş tRNT isə P saytına keçir (Pillə 4). İndi dövrə, at$_3$ gətirən növbəti üçlü kompleksin A saytına birləşməsi ilə yenidən başlaya bilir. İkinci və ardınca gələn elonqasiya dövrələrində E saytında olam tRNT pillə 2-də olduğu kimi, EF1α·GTP-dəki GTP-nin hidrolizi ilə induksiya olunan konformasiya dəyişilməsi nəticəsində E saytından çıxarılır.

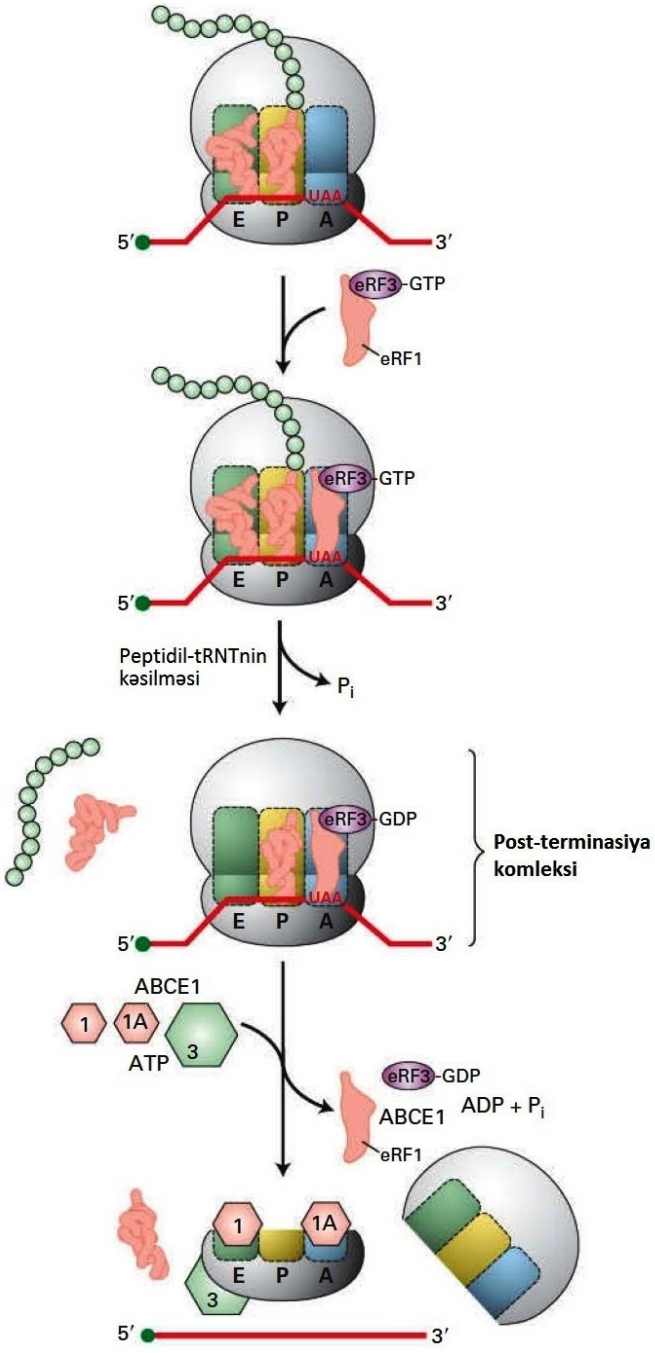
və tRNT-lərin ümumi əsas domenləri b (məsələn, D və TΨCG ilgəkləri, bax Şəkil 5-20) A və P saytlarında tRNT-ni stabilləşdirir, bu zaman başqa RNT-RNT qarşılıqlı əlaqələri düzgün kodon-antikodon cütləşməsini hiss edir və genetik kodun düzgün oxunmasını təmin edir. Sonra, rRNT-lərlə bütün tRNT-ləin ümumi domenləri arasındakı qarşılıqlı əlaqələr ribosomun hər dəfə bir üç-nukleotidli kodonla mRNT üzərində yerdəyişməsi ilə tRNT-lərin A, P və E saytlar arasında hərəkətinə səbəb oldu.

Stop Kodona Çatdıqda Translyasiya Riliz Faktorla Dayandırılır.

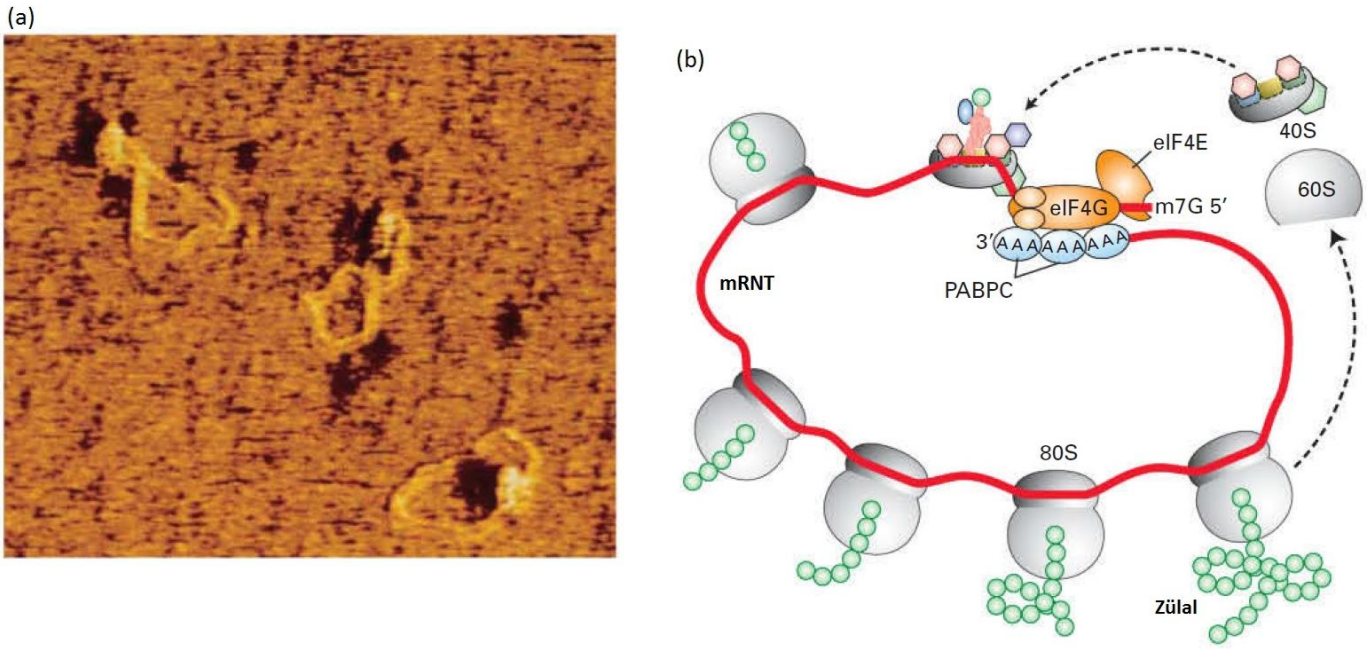
Translyasiyanın axırıncı mərhələsi, inisiasiya və elonqasiya kimi, mRNT-tRNT-peptidil kompleksinin taleyini həll edən yüksək spesifik molekulyar siqnalları tələb edir. İki tip zülal mənşəli spesifik riliz faktor (RF) aşkar olunmuşdur. Eukariotlarda formaca tRNT-yə oxşar olan eRF1 ribosomun A saytına birləşməklə və stop kodonu birbaşa tanımaqla fəaliyyət göstərir. Əvvəllər müzakirə olunmuş bəzi inisiasiya və elonqasiya faktorlarında olduğu kimi, ikinci eukariotik riliz faktor, eRF3 GTP-birləşdirən zülaldır. eRF3·GTP fəaliyyəti eRF1 ilə razılaşdırılmış şəkildə olub peptidil-tRNT-nin kəsilməsini sürətləndirir və beləliklə tamamlanmış zülal zəncirini azad edir və translyasiyanı sona çatdırır (Şəkil 5-26). Bakteriyalar iki riliz faktora malikdir (RF1 və RF2), bunlar funksiyalarına görə eRF1 və GTP-birləşdirən zülala (RF3) analoq olan eRF3 riliz faktorlara analojidirlər. Bir daha, eRF3 GTP-aza stop kodonun eRF1 tərəfindən düzgün tanınmasını aşkar edir. P saytında tRNT-yə birləşmiş peptidil-tRNT əlaqəsi üç stop kodondan hər hansı birinin eRF1 tərəfindən düzgün tanınmasına qədər qırılmır, bu da zülal sintezində ***doğruluğun-oxumasına*** aid başqa bir misaldır.

Sintezi tamamlanmış zülalın azad olması tRNT-ni P saytında sərbəst buraxır, amma mRNT hələ də A saytına birləşmiş şəkildə olan eRF1 və eRF3•GDP ilə birlikdə 80S ribosomla assosasiyada qalır. Eukariotlarda ribosomun təkrar istifadəsi o vaxt baş verir ki, bu postterminasiya kompleksi ABCE1 adlandırılan zülalla birləşmiş olur və bu zülal ATP-nin hidrolizindən alınan enerjini istifadə edib ribosomu subvahidlərə ayıraraq mRNT-ni və tRNT-ni P saytında buraxır. Həmçinin, subvahidlərin ayrılmasında tələb olunan inisiasiya faktorları eIF1, eIF1A və eIF3 40S subvahidə birləşirlər, və onu təkrar inisiasiyaya üçün hazır edirlər (Şəkil 5-24, *yuxarıda*). Həqiqətdə, sadəlik üçün Şəkil 5-26-da göstərildiyi kimi, mRNT heç zaman buraxılmır (azad olmur). Əksinə, mRNT elonqasiyanın müxtəlif mərhələlərində olan başqa ribosomlarla assosasiyada olur, poli-A quyruğa birləşmiş PABPC və 5′-papaqla assosasiyada olan eIF4 kompleksin mRNT-nı başqa 43S pre-inisiasiya kompleksi ilə birləşməyə hazır edir (Şəkil 5-24).

Zülal sintezindəki bu funksiyadan başqa ribosomlar keçici olaraq yeni sintez olunmuş polipeptid zəncirlərin ribosom səthindən çıxdıqdan dərhal sonra bükülməsində iştirak edən çaperon zülallarla da əlaqədə olurlar (bax şəkil 3-17). Biz Fəsil 13-də görəcəyik ki, endoplazmik şəbəkəyə (ER) daxil olması nəzərdə tutulan, ER lümeni daxilinə daşınan və sonra da hüceyrədən xaricə ifraz olunan və ya lizosom kimi başqa orqanoid daxilinə keçirilən zülalları sintez edən ribosomlar SRP (siqnal tanıyan zərrəcik) adlanan ribonukleopritein (ribonukleo-zülal) komleksi ilə də əlaqədə olur, bu komleks, yeni sintez olunan polipeptid ER-ə daxil olmaq üçün xüsusi kanalla rastlaşana qədər zülal sintezini arrest edir. SRP, zülal sintezinin davam etdirilməsinə icazə veriləndə bu zülalların ER kanalları vasitəsilə daxil edilməsinə və onların bərkidilməsinə kömək edir.



Şəkil 5-26 Eukariotlarda translyasiyanın terminasiyası. Yeni polipeptid zənciri sintez edən ribosom stop kodona (UAA, UGA, UAG) çatanda riliz (buraxma) faktoru eRF1 eRF3·GTP ilə birlikdə A saytına keçir. Birləşmiş GTP-nin hidrolizi P saytında peptid zəncirinin tRNT-dən kəsilməsi ilə və tRNT-nin E saytından çıxarılması ilə müşayət olunur və post terminasiya kompleksi formalaşır. Ribosomal subvahidlər ABCE1 ATP-azanın eIF1, eIFA və eIF3 ilə birlikdə təsiri nəticəsində ayrılırlar. 40S subvahid ayrıldıqdan sonra eIF-lərlə birləşir və translyasiyanın yeni dövrüəsi üçün hazır olur (bax Şəkil 5-24).



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 5-27 mRNT-nin dairəvi quruluşu translyasiyanın effektivliyini artırır. Eukariotlarda mRNT üç zülalın qarşılıqlı təsiri nəticəsində dairəvi quruluş əmələ gətirir. (a) Mayadan alınmış poli(A)-birləşdirən zülalın [PABP; ali eukariotlardakı nüvə (PABPN) və sitoplazmatik (PABPC) zülallara qarşı *S. serevisiae*-də yalnız bir PABP vardır], eIF4E və eIF4G iştirakı ilə eukariotik mRNT elektron mikrofotosunda (force-field electron micrograph) görünə bilən dairəvi quruluşu əmələ gətirir. Bu quruluşda zülal-zülal və zülal-mRNT qarşılıqlı əlaqələri mRNT-nin 5′ və 3′ sonluqları arasında körpü əmələ gətirir. (b) Dairəvi polisomlarda zülal sintezinin modeli və ribosom subvahidlərinin yenidən istifadəsi. Çoxsaylı fərdi ribosomlar eyni vaxtda, burada göstərilmiş, 3′ və 5′ sonluqlara birləşmiş zülallar arasındakı qarşılıqlı əlaqə ilə stabilləşən dairəvi formada olan eukariot mRNT-ni translyasiya edə bilirlər. Ribosom translyasiyanı tamamlayan kimi 3′ sonluqdan dissosasiya edir, ayrılmış subvahidlər çox tez yaxınlıqda olan 5′ papağı (m^7G) və PABPC-birləşmiş poli(A)-quyruğu tapır və yeni zülal sintezi dövrəsini başlayır. [(a) hissəsindəki şəkil A.Sachs və Sandra Wells tərəfindən verilmişdir

Polisomlar və Ribosomların Sürətli Təkrar İstifadəsi Translyasiyanın Effektivliyini Artırır

Tipik orta-ölçülü zülal sintez edən tək bir eukariotik mRNT molekulunun translyasiyası bir dəqiqədən iki dəqiqəyə qədər zamanda baş verir. İki hadisə hüceyrələrin zülal sintez etməsinin ümumi sürətini əhəmiyyətli dərəcədə artırır: bir mRNT molekulunun eyni zamanda çoxsaylı müxtəlif ribosomlarla translyasiyası və ribosom subvahidlərinin translyasiyanı başa vurub mRNT-nin 3′ sonluğundan ayrıldıqdan dərhal sonra təkrar istifadəyə getməsi. mRNT-nin eyni zamanda çoxsaylı ribosomlarla translyasiyası elektron mikroskopu altında və ya sedimentasiya analizləri yolu ilə müşahidə oluna bilər, mRNT-yə yapışmış ribosomlarda yeni sintez olunan polipeptid zəncirinin uzunaması müşahidə edilir. **Poliribosom** və ya ***polisom*** adlandırılan belə quruluşlar bir sıra toxumaların elektron mikrofotosunda dairələr şəklində görünürlər. Təmizlənmiş inisiasiya faktorları ilə aparılan sonrakı tədqiqatlar poliribosomların dairəvi formada olduğunu göstərdi və ribosomların səmərəli şəkildə təkrar istifadə mexanizmini aşkar etdi.

Bu tədqiqatlar göstərdi ki, poli(A)-birləşdirən zülalların (PABP) çoxsaylı nüsxəsi həm mRNT-nin poli(A)-quyruğu ilə həm də eIF4-ün eIF4G subvahidi ilə qarşılıqlı əlaqədə olur. eIF4-ün eIF4G subvahidi mRNT-nin 5′-papaq quruluşuna birləşdiyindən, mRNT molekulunun iki sonluğu müdaxilə edici aralıq zülallarla (intervening proteins) körpü kimi birləşdirilərək "dairəvi" mRNT molekulu yaranır (Şəkil 5-27A). Polisomun hər iki ucu nisbətən bir-birinə yaxın olduğundan 3′ sonluqdan ayrılan ribosomal subvahidlər mRNT-nin 5′ sonluğuna yaxın olurlar, bu da onların yenidən 40S subvahidlə və onunla assosasiyada olan inisiator faktorları, 5′ papağa birləşmiş eIF4 ilə qarşılıqlı əlaqə yaradıb yenidən-inisiasiyaya şərait yaradırlar. Belə güman olunur ki, Şəkil 5-27b-də təsvir olunan dairəvi sintez yolu (pathway) ribosomların təkrar istifadəsini sürətləndirir və zülalların sintezinin səmərəliliyini artırır.

GTP-aza Superailəsinə Daxil Olan Zülallar Translyasiyanın Bir-sıra Keyfiyyətə Nəzarət Mərhələlərində Fəaliyyət Göstərir.

Biz indi görə bilərik ki, bir və ya daha artıq GTP-birləşdirən zülallar translyasiyanın hər bir mərhələsində iştirak edir. Bu zülallar, keçirici zülalların **GTP-aza superailəsinə** aid olub GTP birləşmiş fəal və GDP birləşmiş qeyri-fəal formalar arasında dövrə edərək keçirlər (bax Şəkil 3-34). Birləşmiş GTP-nin hidrolizi GTP-azanın özündə və onunla assosasiyada olan başqa zülallarda konformasiya dəyişikliyinə səbəb olur, bu da bir sıra kompleks molekulyar proseslər üçün kritik əhəmiyyət kəsb edir. Məsələn, translyasiyanın inisiasiyasında eIF2·GTP-nin eIF2·GDP-yə hidrolizi start kodona çatanda mRNT-nin skaninqinin daha da davam etməsinə mane olur və imkan yaradır ki, böyük ribosomal subvahid kiçik subvahidə birləşsin (Şəkil 5-24, pillə 6). Buna oxşar olaraq, eIF5B•GTP böyük və kiçik

ribosomal subvahidlərin müvəffəqiyyətlə assosasiya etmələrini ekranlaşdırır (Şəkil 5-24 pillə 8). Yada salaq ki, əgər düzgün kompleks yaranmırsa eIF5B•GTP GTP-ni hidroliz etmir və kompleks qeyri stabil olur, sərbəst şəkildə ayrılırlar və yenidən birləşməyə cəhd edirlər. Elonqasiyanın baş verməsi üçün subvahidlərin düzgün düzlənməsi tələb olunanda eIF5B GTP-ni GDP-yə hidroliz edir və düzgün kompleksi yerinə bərkidir. GTP-nin yüksək enerjili β-γ rabitəsindən ayrılan enerji reaksiyanı bir istiqamətdə aparır. Başqa bir nümunədə zəncirin elonqasiyası zamanı EF1α·GTP-nin EF1α·GDP-yə hidroliz olunması yalnız o zaman baş verir ki, A saytı yüklənmiş tRNT ilə onun antikodonunun bu saytdakı kodonla əsas cütləri əmələ gətirməsilə tutulmuş olsun. GTP hidrolizi EF1α-da konformasiya dəyişikliyi əmələ gətirməklə ona birləşmiş tRNT-nin buraxılmasına səbəb olur, və imkan yaradır ki, yüklənmiş tRNT-nin aminoasilləşmiş 3′ sonluğu peptid əlaqələrinin formalaşması üçün tələb olunan mövqeyə keçsin (Şəkil 5-25, pillə 2). EF2·GTP-nin EF2·GDP-yə hidroliz olunması ribosomun mRNT boyunca düzgün yerdəyişməsinə (translokasiyasına) imkan yaradır (bax Şəkil 5-25, pillə 4) və eRF3·GTP-nin hidroliz olunaraq eRF3·GDP-yə keçməsi translyasiyanın düzgün terminasiyasını təmin edir (Şəkil 5-26).

Nonsens Mutasiya Zülal Sintezini Vaxtından Əvvəl Dayandırır.

İstənilən orqanizmdə geni fəalsızlaşdıran mutasiya tiplərindən biri, normal halda amin turşusu kodlaşdıran kodonu stop kodona çevirən əsas cütlərinin dəyişilməsidir məsələn UAC kodonun (tirozini kodlaşdıran) UAG kodona (stop kodon) dəyişilməsi. Əgər bu açıq oxunan çərçivənin başlanğıcında baş verərsə, o zaman alınan kəsilmiş zülal parçası adətən qeyri funksional olur. Belə mutasiyalar adətən ***nonsens* (*mənasız*)** mutasiya adlanır, çünki genetik kod triplet kodon ardıcıllığı ilə tədqiqatçıların oxuduğu kimi, hər bir triplet bir amin turşusuna bərabər tutulur, aydın olmuşdur ki, üç stop kodon heç bir amin turşusunu kodlaşdırmır - onlar heç bir məna kəsb etmir (did not "make - sense").

E.coli bakteriyası ilə aparılmış genetik tədqiqatlarda aşkar edilmişdir ki, nonsens mutasiyanın təsiri tRNT genində aparılan ikinci mutasiya ilə suppressiya edilə bilər. Bu o zaman baş verir ki, tRNT genində antikodonu kodlaşdıran ardıcıllıq orjinal stop kodona komplementar olan tripletə dəyişdirilsin, başqa sözlə, $tRNT^{Tyr}$-də mutasiya onun antikodonunu GUA-dən CUA-ə dəyişilsin, bu zaman o UAG stop kodonla əsas cütü əmələ gətirə bilər. Alınmış bu mutant tRNT hələ də tirozin-aminoasil sintetaza tərəfindən tanına bilir və onu tirozin amin turşusu ilə birləşdirə bilir. Hər iki mutasiya - həm orjinal nonsens mutasiyaya həm də $tRNT^{Tyr}$ geninin antikodonunda olan ikinci mutasiyaya malik olan hüceyrə uyğun olaraq mutant stop kodonun yerinə tirozin amin turşusunu daxil edə bilir və imkan verir ki, zülal sintezi orjinal nonsens mutasiyanı keçərək davam etsin. Bu supressiya mexanizmi yüksək dərəcədə səmərəli deyil, belə ki, stop kodonu UAG olan normal mRNT-nin translyasiyası əksər hallarda normal mövqedə qurtarır (terminasiya edir). Əgər nonsens mutasiyaya malik olan orjinal genin kodlaşdıraraq yaratdığı zülal onun əhəmiyyətli funksiyası üçün kifayət edirsə birinci mutasiyanın təsiri tRNT geninin antikodonunda aparılan ikinci mutasiya ilə ***supressiya olunmuş*** hesab edilir.

Nonsens supressiya olunma mexanizmi bakteriyalarda aparılan genetik tədqiqatlar üçün güclü metod hesab olunur. Məsələn, bu metodla mutant bakterial viruslar ayrıla bilər, belə ki, onlar normal hüceyrələrdə bitmirlər, amma nonsens-supressiyalı tRNT ekspressiya edən hüceyrələrdə bitirlər, çünki mutant virus onun əhəmiyyət kəsb edən genində nonsens mutasiyaya malikdir. Nonsens supressiyalı hüceyrələrdə bitən bu cürə mutant viruslar sonra mutasiyanı supressiya edə bilməyən normal hüceyrələri yoluxdurmaqla mutant genlərin funksiyalarını analiz edən eksperimentlərdə istifadə oluna bilər və virusun həyat tsiklində mutant zülalın olmadığı şəraitdə hansı mərhələnin qüsurlu olduğu analiz oluna bilər.

5.4 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

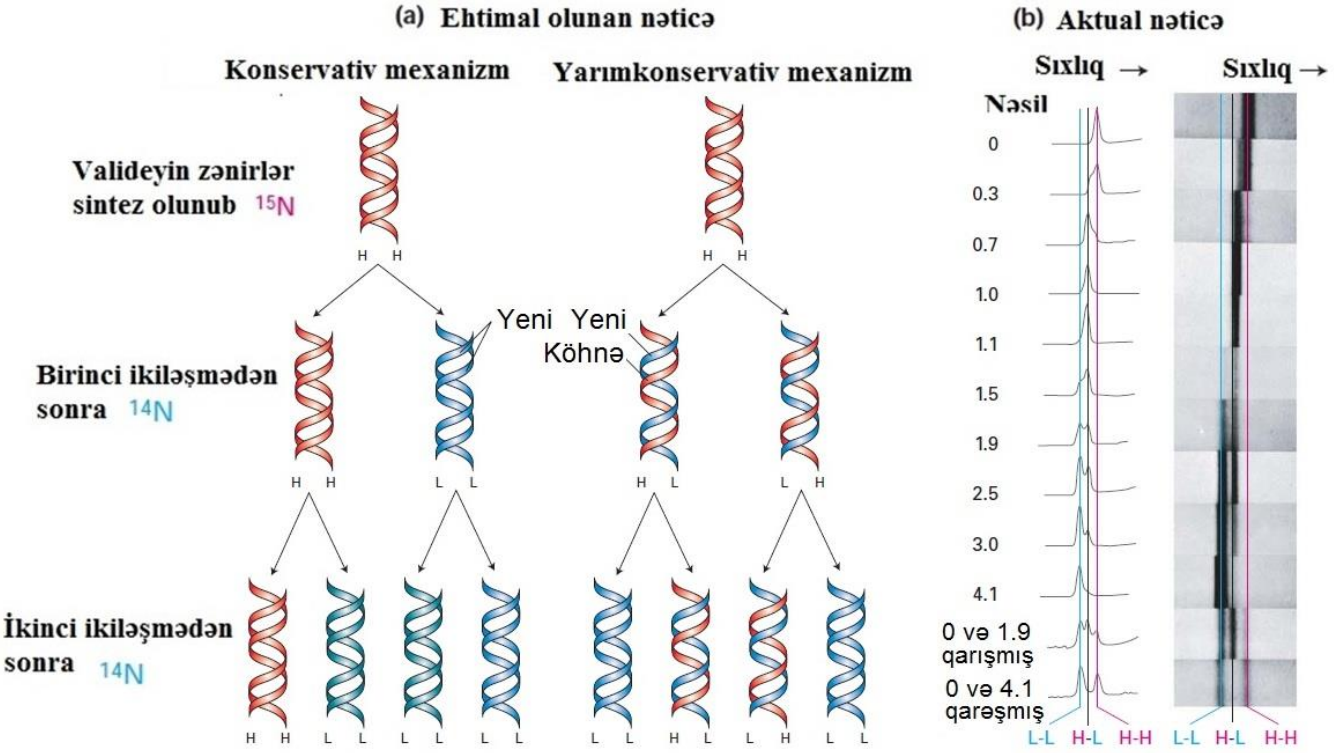
Ribosomlarda Zülalların Mərhələli Sintezi

- Bakterial, arxeal və eukariot ribosomlar – translyasiyanın baş verdiyi böyük ribonukleoprotein komplekslər – kiçik və böyük subvahidlərdən təşkil olunmuşlar (bax Şəkil 5-3). Hər bir subvahid çoxsaylı müxtəlif zülallardan və bir əsas rRNT molekulundan (böyük və ya kiçik) təşkil olunur (bax Cədvəl 5-3). Böyük subvahid bakteriyalarda həmçinin bir köməkçi 5S rRNT molekuluna və eukariotlarda iki köməkçi 5S və 5.8S rRNT (onurğalılarda) molekullarına malikdir.
- rRNT analoqları çoxsaylı müxtəlif növlərdə (oranizmlərdə) bir-birinə çox oxşar olan və çoxlu miqdarda sütun-ilgəklərdən və zülalları, mRNT-ləri və tRNT-ləri birləşdirən saytlardan ibarət olan kifayət qədər oxşar üç-ölçülü quruluşda bükülürlər. Daha çox oxşar olan ribosomal zülallar rRNT molekullarının kənarları (periferiyaları) ilə birləşirlər.
- Bütün hüceyrələrdə tapılmış iki metionin tRNT-lərin yalnız biri ($tRNT_i^{Met}$) translyasiyanın inisiasiyasında fəaliyyət göstərir.
- Translyasiyanın hər bir mərhələsi - inisiasiya, zəncirin elonqasiyası və terminasiya spesifik zülal faktorlarının olmasını, o cümlədən hər mərhələ uğurla başa vurulduqda özündəki GTP-ni GDP-yə hidroliz edən GTP-birləşdirən zülalların olmasını tələb edir.
- İnisiasiya zamanı, ribosomal subvahidlər mRNT molekulunda translyasiyanın start saytına yaxın rayona toplanır, bu zaman amin-sonluq metionini (Met-$tRNTi^{Met}$) daşıyan tRNT molekulu start kodonla əsas cütü əmələ gətirir (Şəkil 5-24).
- Zəncirin elonqasiyası təkrarlanan dörd mərhələdən ibarət olan tsikldir: yeni gələn aminoasil-tRNT-nin ribosomun A saytına zəif birləşməsi; düzgün aminoasil-tRNT-nin A saytına möhkəm birləşməsi istifadə olunmuş əvvəlki tRNT-nin E saytından buraxılması ilə müşayət olunur; uzunamaqda olan polipeptid zəncirin yeni gəlmiş amin turşusuna keçirilməsi böyük rRNT tərəfindən kataliz olunur; ribosomun növbəti kodona yerdəyişməsi (translokasiyası), bununla peptidil-tRNT-ni A saytından P saytına keçirir və asilsizləşmiş tRNT P saytından E saytına keçir (bax Şəkil 5-25).
- Zəncirin elonqasiyanın hər bir tsiklində ribosom, GTP-birləşdirən zülallarla ekranlaşdırılan iki konformasiya dəyişikliyinə məruz qalır. Bu zülallardan birinci (EF1α) yeni gələn aminoasil-tRNT-nin sıx şəkildə A saytına birləşməsinə və tRNT-nin E saytından çıxarılmasına imkan yaradır, ikinci isə translokasiyanı ekranlaşdırır.

- Translyasiyanın terminasiyası iki tip terminasiya faktoru ilə yerinə yetirilir: stop kodonu tanıyanlar və peptidil-tRNT-nin hidrolizini sürətləndirənlər (bax Şəkil 5-26). Bir daha, stop kodonun düzgün tanınması GTP-aza ilə həyata keçirilir (eRF3).
- Zülal sintezinin səmərəliliyi, vahid mRNT molekulunun poliribosom və ya sadəcə olaraq polisom adlandırılan çoxsaylı müxtəlif ribosomlarla eyni zamanda translyasiya olunması ilə artırılır. Eukariot hüceyrələrdə, zülallarla-həyata keçirilən qarşılıqlı təsir poliribosomun hər iki ucunu bir-birinə çox yaxın məsafəyə gətirir və bununla ribosom subvahidlərinin sürətlə təkrar istifadəsinə imkan yaratmaqla zülal sintezinin effektivliyini artırır (bax Şəkil 5-27b).

5.5 DNT-nin Replikasiyası

Biz artıq, DNT-nin nukleotid ardıcıllığında kodlaşdırılan genetik informasiyanın hüceyrə funksiyalarının çoxunu həyata keçirən zülallara necə translyasiya olunduğunu gördük, indi biz hüceyrənin bölünməsinə hazırlıq zamanı DNT-nin replikasiyası prosesində DNT ardıcıllığının dəqiq surətinin çıxarılmasının nə qədər əhəmiyyətli olduğunu qiymətləndirə bilərik (bax Şəkil 5-1, pillə 4). DNT-nin ikiqat-zəncirli quruluşunda nukleotid əsasların ardıcıl cütləşməsi Uotsona və Krikə göstərdi ki, yeni DNT zəncirləri mövcud olan DNT zəncirlərini (***valideyin zəncirləri)*** templeyt kimi istifadə etməklə sintez olunaraq valideyin zəncirlərə komplementar olan yeni ***qız zəncirləri*** yaradırlar.



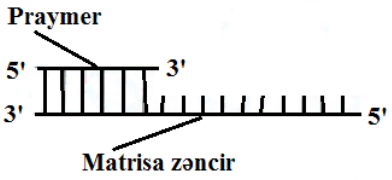
EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 5-28 Meselson Stahl təcrübəsi. Bu təcrübə göstərdi ki, DNT yarımkonservativ mexanizmlə replikasiya edir. *E. coli* hüceyrələri əvvəlcədən "ağır" (radioaktiv nişanlanmış) azot (^{15}N) olan ammonium duzu ilə hazırlanmış mühitdə əkilib o vaxta qədər yetişdirilir ki, hüceyrənin DNT-si radioaktiv nişanlanmış olsun. Sonra hüceyrələr normal "yüngül" azot (^{14}N) olan mühitə keçirilir. Təcrübə obyektindən dövrü olaraq nümunələr götürülərək sıxlıq qradient-sentrifuqalama yolu ilə hər bir nümunənin DNT analizi aparılmışdır, bu proses zamanı makromolekullar sıxlıqlarına görə ayrılırlar. Bu metod ağır-ağır (H-H), yüngül-yüngül (L-L) və ağır-yüngül (H-L) dupleksləri fərqli bəndlərə ayırır. (a) *E.coli* hüceyrələri ^{14}N-tərkibli normal mühitə keçirildikdən sonra, DNT-nin replikasiyasının konservativ və ya yarımkonservativ mexanizmlə getməsindən asılı olaraq ^{15}N-nişanlanmış DNT-dən sintez olunmuş qız dupleks molekulların gözlənilən tərkibi. Valideyin ağır (H) zəncirlər qırmızı rəngdə göstərilir; ^{14}N-tərkibli normal mühitə keçirildikdən sonra sintez olunmuş yüngül (L) zəncirlər mavi rəngdə göstərilir. Qeyd etmək lazımdır ki, konservativ mexanizm heç vaxt H-L DNT-ni yaratmır, eləcə də yarımkonservativ mexanizm heç vaxt H-H DNT yaratmır, amma növbəti və sonrakı bölünmələrdə H-L DNT-ni yaradır. ^{14}N-tərkibli normal mühitdə davam edən bölünmələr nəticəsində ilkin DNT-də olan ^{15}N-ağır (H) zəncir tədricən o qədər durulaşdırılır ki, ümumi DNT kütləsi hər iki mexanizmdə əsasən L-L tərkibdən ibarət olur. (b) Sıxlığa görə qradient-sentrifuqalama ilə ayrılmaya məruz qoyulmuş DNT molekulunun, ^{15}N-nişanlanmış DNT olan *E.coli* hüceyrələrin ^{14}N-tərkibli normal mühitə keçirilənə qədər və keçirildikdən sonrakı xalis bənd əmələ gətirmə profili. DNT bəndləri UV işıq altında baxılaraq şəkili çəkilmişdir. Soldakı izlər fotoqrafik siqnalların sıxlıq ölçüsüdür və nəticə etibarı ilə, soldan sağa sentrifuqa olunmuş hüceyrələr üzrə DNT qatılığını bildirir. ^{14}N-tərkibli normal mühitə keçirilərək davam edən nəsillərin nömrələri (uzaq soldakı) *E.coli* hüceyrələrinin mühitdə qatılğı saymaqla təyin edilmişdir. Alınan qiymət, hər dəfə nümunə götürülən zaman DNT replikasiyası tsiklinin sayına uyğun gəlir. Bir nəsil yetişmədən sonra, ekstraksiya olunmuş bütün DNT H-L DNT sıxlığına bərabər olmuşdur. 1.9 nəsil yetişmədən sonra ayrılan DNT-nin yarısı H-L DNT sıxlığında olmuşdur; ikinci yarısı isə L-L DNT sıxlığında olmuşdur. Əlavə yeni nəsil yetişməsindən sonra ayrılmış DNT-nin daha çox və getdikcə daha çox hissəsi L-L dupleksləri kimi olmuşdur; H-H dupleksləri isə artıq rast gəlinmirdi. Bu nəticələr (a) hissəsində təsvir olunan, yarımkonservativ replikasiya mexanizminin ehtimal olunan profilinə uyğun gəlir. Sıxlıq qradientində H-H, H-L və L-L DNT-lərin mövqeyini dəqiq görmək üçün aşağıdakı iki sentrifuqa hüceyrələrində H-H DNT ilə 1.9 və 4.1 nəsil dövründən ayrılmış DNT qarışığına malik olmuşlar. Bax M.Meselson and F.W.Stahl, 1958, *Proc.Nat.Acad. Sciş USA* 44:671 [(b) hissəsindəki foto nəzakətlə M.Meselson and F.W.Stahl tərəfindən verilmişdir.]

Belə cütləşən-əsasların templeyt modeli nəzəri olaraq ya konservativ ya da yarımkonservativ mexanizmlərlə baş verə bilir. *Konservativ* mexanizmdə iki qız zəncir ikiqat-zəncirli yeni DNT molekulunu formalaşdırmalıdır və valideyin ikiqat zəncir intakt qalmalıdır. *Yarımkonservativ* mexanizmdə valideyin zəncirlər həmişəlik ayrılırlar və hər biri onlara əsas cütləri ilə birləşmiş yeni qız zəncirləri ilə ikiqat-zəncirli molekulu yaradırlar. DNT-nin yarımkonservativ mexanizmlə replikasiyasını qəti dəlillərlə sübut edən təsdiq, Şəkil 5-28-də şərh olunduğu kimi, M. Meselson və W.F. Stahlın klassik eksperimentlərindən alınmışdır.

DNT-nin temleyt zəncirinin surətinin komplementar zəncirlərə köçürülməsi DNT replikasiyasının, DNT-nin RNT-yə transkripsiyasının və eləcə də bu fəsildə sonra müzakirə edəcəyimiz DNT-nin reparasiyası və rekombinasiyasının ümumi xüsusiyyətləridir. Bütün hallarda, templeytda olan informasiya xüsusi nukleotid ardıcıllığı şəkilində qorunub saxlanır. Bəzi viruslarda bir-zəncirli RNT molekulları komplementar RNT və ya DNT zəncirlərinin sintezi üçün templeyt rolunu oynayır. Amma, hüceyrədə sintez olunan DNT və RNT molekullarının böyük əksəriyyəti mövcud olan ikiqat DNT zəncirləri üzərində sintez olunurlar.

Replikasiyanın İnisiasiyası Üçün DNT Polimeraza Praymer Tələb Edir

DNT RNT sintezinə analoji olan üsulla dezoksiribonukleozid-5′-trifosfat (dNTP) sələflərdən sintez olunur. Həmçinin, RNT sintezində olduğu kimi DNT sintezi də, həmişə 5′→3′ istiqamətində davam edir, çünki zəncirin uzunaması uzunamaqda olan zəncirin 3′ oksigeni ilə yeni dNTP-nin α fosfatı arasında fosfodiefir əlaqələrinin formalaşması nəticəsində baş verir (Şəkil 5-10a). Əvvəllər müzakirə olunduğu kimi, RNT polimeraza ikiqat DNT üzərində transkripsiyanın start saytını tapa bilir və RNT sintezini komplementar olaraq DNT templeyt üzərində başlayır (bax Şəkil 5-11). Bunun əksinə, DNT polimeraza zəncirin ***de-novo*** sintezini başlaya bilmir, əvəzində onlar yeni zəncirin sintezinə başlamaq üçün **praymer** adlandırılan qısa DNT və ya RNT zəncirin olmasını tələb edir. Templeyt zəncirlə əsas-cütü əmələ gətirən praymer istifadə ediləndə DNT polimeraza dezoksiribonukleotidləri, templeyt zəncirin ardıcıllığında göstərildiyi kimi, 3′ sonluğundakı sərbəst hidroksil qrupuna əlavə edir:



RNT praymer olarkən yeni formalaşan qız zəncirin 5′ sonluğu RNT, 3′ sonluğu isə DNT olur.

DNT-nin İkiqat Zənciri Açılır və DNT Replikasiya Çəngəlində Qız Zəncirlər Formalaşır

Replikasiya zamanı ikiqat-zəncirli DNT-nin templeyt kimi fəaliyyət göstərməsi üçün iki bir-birinə sarınmış zəncirlər açılmalıdır və ya əriməlidir ki, zəncirlərdə olan əsaslar yeni sintez olunan qız zəncirlərdə polimerləşən dNTP əsasları ilə əsas-cütləri əmələ gətirməsi mümkün olsun. Valideyin DNT zəncirlərinin belə açılması ***helikazalar*** adlanan xüsusi fermentlərlə aparılır, DNT molekulunda replikasiyanın başlandığı unikal sayt ***replikasiya mənşəyi*** (***replication origin)*** və ya sadəcə olaraq ***mənşə*** (***origin***) adlanır. Müxtəlif orqanizmlərdən olan mənşələr nukleotid ardıcıllığlarına görə çox fərqlənirlər, hərçənd ki, onların hamısı AT-zəngin ardıcıllığa malikdirlər. Helikazalar valideyin DNT zəncirini mənşə nahiyəsində açdıqdan sonra **praymeaza** adlandırılan xüsusi RNT polimeraza açılmış templeyt zəncirə komplementar olan qısa (~12 nukleotid uzunluqda) RNT praymeri sintez edir. Komplementar valideyin DNT zənciri ilə əsas cütü əmələ gətirən praymer sonra *DNT polimerza* α vasitəsi ilə daha 25 nukleotid uzunayır və 5′ ucu RNT, 3′ isə DNT olan praymeri əmələ gətirir. Bu praymer sonra *DNT polimerza* δ vasitəsi ilə daha da uzunayır və yeni qız zəncirini əmələ gətirir.

Bütün bu zülalların bir yerə gəldiyi və yeni qız zəncirləri sintez etdiyi DNT rayonu **replikasiya çəngəli** adlanır. Replikasiya prosesi davam etdikcə replikasiya çəngəli və onunla assosasiyada olan zülallar mənşədən uzaqlaşırlar. Əvvəllər qeyd olunduğu kimi, ikiqat zəncirli DNT-nin lokal açılması **torsional stress**i əmələ gətirir, bu da topoizomeraza I ilə azad edilir. DNT polimerazanın ikiqat DNT zənciri boyunca hərəkət edərək onun surətini çıxarması üçün helikaza ardıcıl olaraq ikiqat zənciri açmalıdır, topoizomeraza isə ardıcıl olaraq əmələ gələn superspiralı açmalıdır.

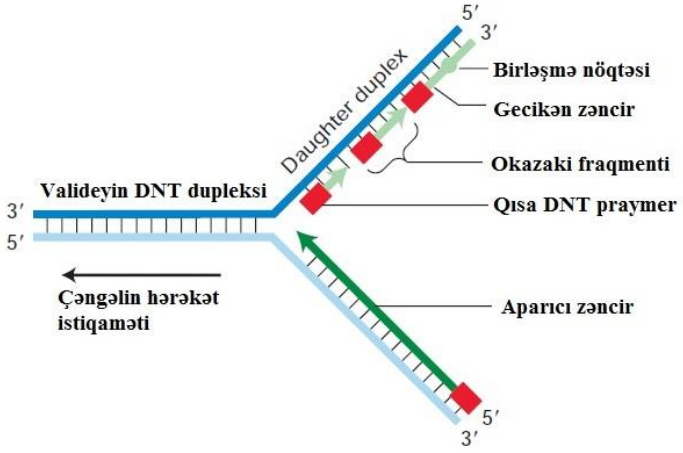
DNT replikasiya çəngəlinin fəaliyyətində əsas mürəkkəblik (çətinlik) DNT-nin xüsusiyyətindən ortaya çıxır: ikiqat zəncirli valideyin DNT-nin zəncirləri antiparaleldir, və DNT polimeraza nukleotidləri uzunamaqda olan yeni zəncirə yalnız 5′→3′ istiqamətində əlavə edir (RNT polimerazada olduğu kimi). Qız zəncirlərdən aparıcı zəncir adlanan birinin sintezi ardıcıl olaraq bir RNT praymerdən başlayaraq dayanmadan 5′→3′ istiqamətində - *replikasiya çəngəlinin hərəkəti ilə eyni istiqamətdə* sintez olunaraq davam edir (Şəkil 5-29). Problem **gecikən zəncir (lagging strand**) adlandırılan digər qız zəncirin sintezi zamanı meydana gəlir.

Gecikən zəncirin də uzunaması 5′→3′ istiqamətində baş verməli olduğundan, templeyt zəncirin surətinin çıxarılması necə olsa da replikasiya çəngəlinin hərəkətinin əksi istiqamətində baş verməlidir. Hüceyrə bu incəliyi, ikiqat zəncir açıldıqca ikinci valideyin zəncir üzərində hər 100-200 nukleotiddən bir yeni praymeri sintez etməklə həll edir. Öz templeyt zənciri ilə əsas-cütü əmələ gətirən bu praymerlərin hər biri, 5′→3′ istiqamətində elonqasiya edərək (uzanaraq), onları kəşf edən Reiji Okazakinin şərəfinə **Okazaki fraqmentləri** adlandırılan fasiləli seqmentləri əmələ gətirirlər (çax Şəkil 5-29). Hər bir Okazaki fraqmentinin RNT praymeri qonşu Okazaki fraqmentinin uzunaması yolu ilə uzaqlaşdırılaraq DNT zənciri ilə əvəz olunur, nəhayət sonda ***DNT liqaza*** adlanan ferment bir-birinə yaxın olan fraqmentləri birləşdirir.

DNT Replikasiyasında Bir-sıra Zülallar İştirak Edir

Eukariotlarda DNT replikasiyasında iştirak edən zülalların dəqiqliklə öyrənilməsi (başa düşülməsi) geniş şəkildə kiçik virus DNT-lərinin, o cümlədən meymunları yoluxduran kiçik virusun dairəvi genomu olan SV40 DNT üzərində olmuşdur. Virusla

yoluxmuş hüceyrələr qısa müddət ərzində vahid virus genomunu böyük miqdarda replikasiya edir və DNT replikasiyasının əsas aspektlərini öyrənmək üçün onu ideal model sistem edir. SV40 kimi sadə viruslar sahib orqanizmin (bu halda meymunun hüceyrələri) DNT replikasiya edən maşınından asılı olduğundan, onlar zülallar vasitəsi ilə bir neçə eyni kiçik DNT molekullarında DNT replikasiyasını öyrənmək üçün unikal imkanı təqdim edirlər. Şəkil 5-30-da, replikasiya çəngəlində SV40 DNT-nin surətinin çıxarılmasını koordinasiya edən çox zülallar təsvir edilmişdir. Replikasiya çəngəlində toplanmış zülallar 3-cü Fəsildə təqdim olunan molekulyar maşınların növbəti anlayışlarını (concepts) işıqlandırır. Belə çoxkomponentli komplekslər hüceyrəyə öz əhəmiyyətli funksiyalarını yerinə yetirmək üçün hadisələri davam edən ardıcıllıqla aparmasına imkan verir.



ŞƏKİL 5-29 Aparıcı-zəncir və gecikən-zəncir DNT-lərin sintezi. Nukleotidlər hər bir uzunayan DNT zəncirinə DNT polimeraza vasitəsi ilə ilə 5′→3′ istiqamətində əlavə edilir (oxlarla göstərildiyi kimi). Aparıcı zəncir, 5′ sonluqda bir praymerdən başlayaraq davam edən şəkildə sintez olunur (qırmızı). Gecikən zəncir, ikiqat zəncir açıldıqca dövrü olaraq hər bir yeni rayonda əmələ gələn çoxsaylı RNT praymerlərdən davam etməyən şəkildə (fasilələrlə) sintez olunur. Bu praymerlərin elonqasiyası ilkin olaraq Okazaki fraqmentlərini yaradır. Hər bir uzunayan fraqment özündən əvvəlki praymerə yaxınlaşan kimi praymer atılır və fraqmentlər (atılmış praymerlərin yeri doldurulduqdan sonra) liqaza ilə birləşdirilir. Bu proseslərin təkrar olunması sonda gecikən zəncirin sintezi ilə nəticələnir.

SV40 DNT-ni replikasiya edən molekulyar maşın yalnız bir virus zülalına malikdir. SV40 DNT-nin replikasiyasında iştirak edən qalan bütün zülallar sahib orqanizm tərəfindən təmin olunur. Bu virus zülalı, ***böyük T-antigen*** heksamer ***replikativ helikazanı*** əmələ gətirir və bu zülal ATP hidrolizindən alınan enerjini istifadə edərək replikasiya çəngəlində valideyin zəncirləri açir. Aparıcı və gecikən qız DNT zəncirləri üçün praymerlər ***praymeaza*** kompleksi tərəfindən sintez olunur, bu zaman o qısa (~12 nukleotid uzunluqda) RNT praymerləri sintez edir və RNT praymerlər ***DNT polimeraza α*** (**Pol-α**) tərəfindən təxminən əlavə ~25 nukleotid uzunluqda uzadılır və RNT ilə DNT qatışığından ibarət olan praymer alınır.

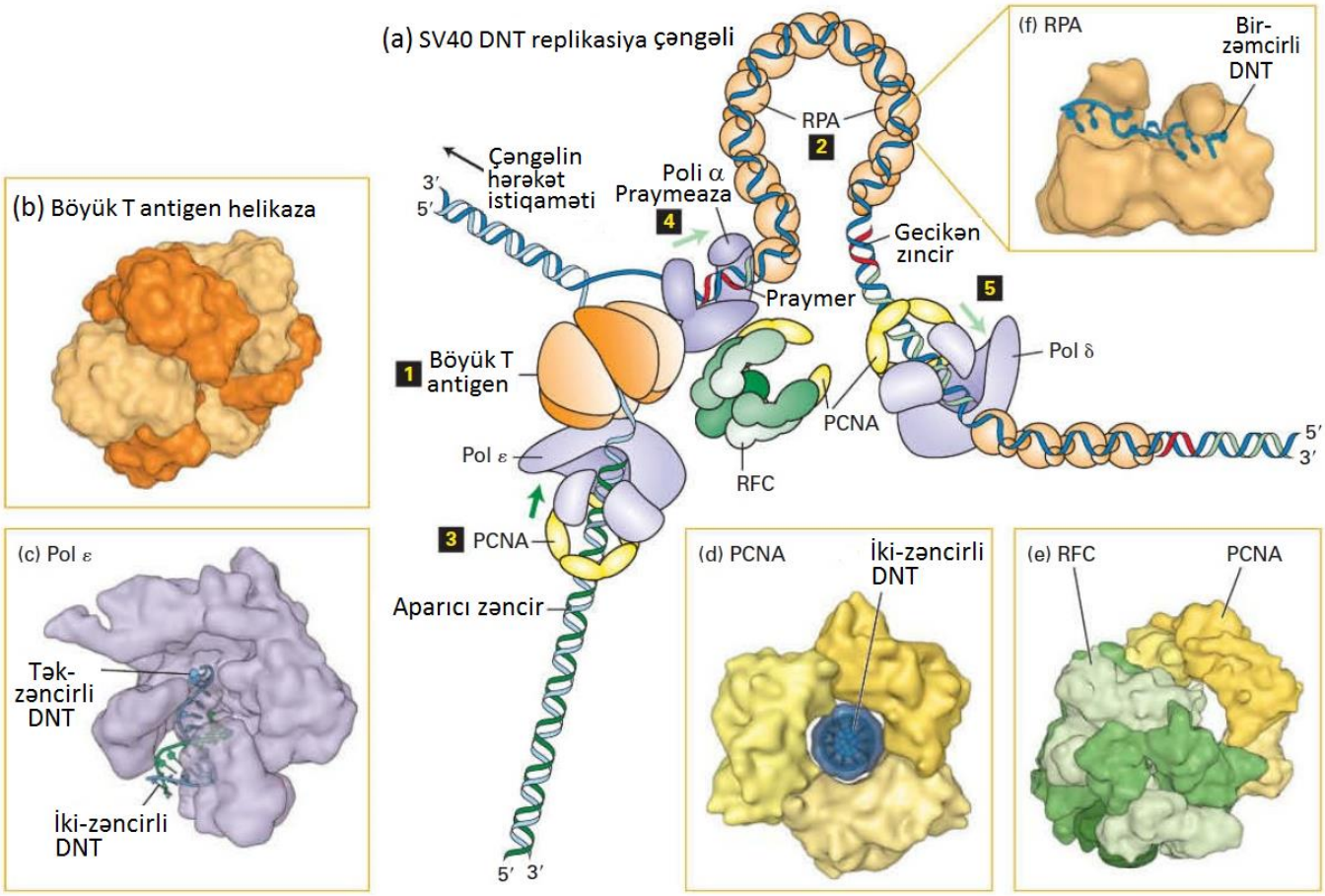
Praymer, ***DNT-polimeraza-δ*** (**Pol δ**) vasitəsi ilə uzunayaraq qız DNT zəncirlərinə çevrilir, bu polimeraza ***doğruluğun-oxunması*** mexanizminə malik olduğundan (bax Bölmə 5.6), onun templeyt DNT zəncirinin surətini köçürən zaman Pol-α ilə müqayisədə səhvlərə yol vermə ehtimalı daha azdır. Hüceyrə DNT-sinin replikasiyası zamanı **Pol-δ** gecikən zənciri sintez edir, *DNT polimeraza ε* (**Pol-ε)** isə aparıcı DNT zəncirinin uzunluğunun əsas hissəsini sintez edir. Pol-δ və Pol-ε hər ikisi PCNA (proliferasiya edən hüceyrə nüvəsi antigeni) ilə kompleks əmələ gətirir, bu kompleks praymer sintezindən sonra praymeaza-Pol-α kompleksini sıxışdırıb çıxarır. Şəkil 5-30d-də təsvir olunduğu kimi, PCNA homotrimer zülal olub ortasında mərkəzi deşik var və bu deşikdən ikizəncirli qız DNT keçir, bununla da PCNA-Pol-δ və PCNA-Pol-ε komplekslərinin templeytdan dissosasiya olunmalarının qarşısı alınır. Beləliklə, PCNA Pol-δ və Pol-ε-un minlərlə nukleotid üçün vahid templeyt zəncir ilə sabit birləşmiş şəkildə qalmasını təmin edən ***sürüşən tutqac*** rolunu oynayır. RFC (replikasiya faktoru C) kimi məlum olan pentamer zülal PCNA halqasını açmaq üçün fəaliyyət göstərərir, beləliklə, o Pol-α vasitəsi ilə sintez olunmuş ikiqat zəncirli DNT-nin qısa rayonunu əhatə edir. Ona görə, çox zaman RFC ***tutqac yükləyicisi*** kimi adlandırılır.

Replikasiya çəngəlində valideyin DNT iki bir-zəncirli templeytrə ayrıldıqdan sonra, aparıcı zəncir böyüyən zənciri replikasiya çəngəlinə qədər uzunada bilən Pol ε vasitəsilə uzunayır. Gecikən zəncirin sintezi üçün bir-zəncirli templeyt heterotrimer zülal olan **replikasiya zülalı A**-nın (**RPA**) çoxsaylı nüsxəsi ilə birləşir (Şəkil 5-30c). RPA zülalların birləşməsi templeytı ümumi quruluş konformasiyasında saxlayır, bu onun surətini Poli δ ilə çıxarmaq üçün optimal edir. Pol-δ valideyin zəncirlə əsas-cütü əmələ gətirən komplementar qız zəncirini sintez etdikdən sonra, birləşmiş RPA zülalları valideyin zəncirdən sıxışdırıb çıxarır.

DNT replikasiyasında iştirak edən bir sıra başqa eukariotik zülallar Şəkil 5-30-da təsvir edilməmişdir. Məsələn, topoizomeraza I valideyin DNT ilə replikasiya edən helikazadan öndə (başqa sözlı Şəkil 5-30-da T-antigenin sol tərəfində) assosasiya edir, valideyin zəncirlərin açılması ilə yaranan torsional stresi yox etmək üçün (bax Şəkil 5-8a) birləşir. Ribonukleaza H və FEN I Okazaki fraqmentinin 5′ sonluğundan ribonukleotidləri uzaqlaşdırır, bu nukleotidlər zəncirin uzunaması zamanı DNT polimeraza δ ilə Okazaki fraqmentlərinə yuxarıya istiqamətdə əlavə olunmuş dezoksinukleotidlərlə əvəz edilir. Ardıcıl Okazaki fraqmentləri, DNT liqaza vasitəsi ilə, standart 5′→3′ fosfoefir əlaqələri ilə birləşirlər. İxtisaslaşmış başqa DNT polimerazalar DNT-də əmələ gələn uyğunsuzluqların və zədələnmələrin bərpa olunmasında iştirak edirlər (bax Bölmə 5.6).

Hər Bir Mənşədən DNT Replikasiyası İkiistiqamətli gedir

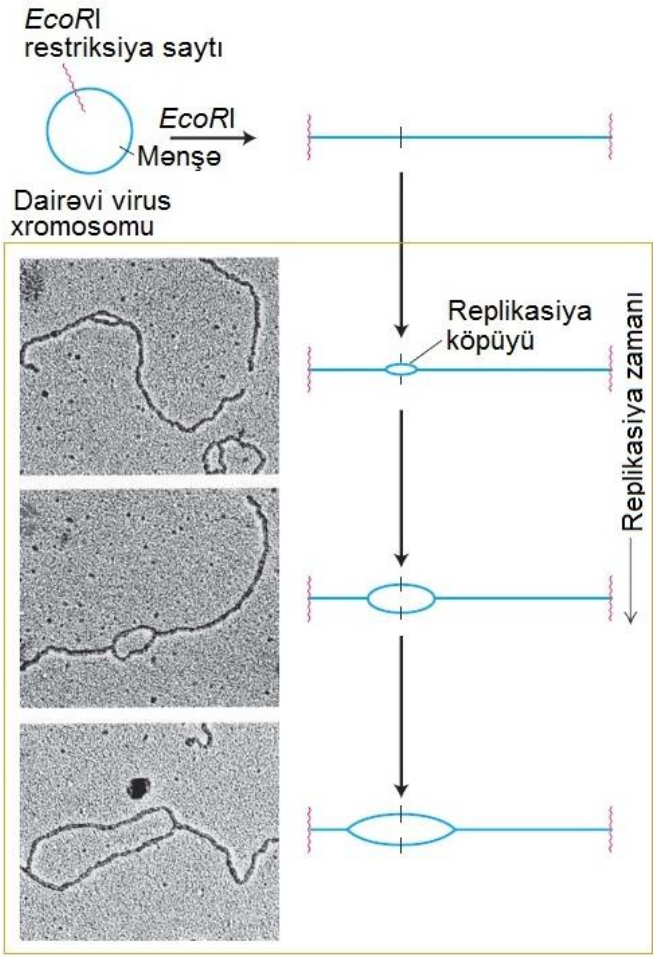
Şəkil 5-29 və 5-30-da göstərildiyi kimi, replikasiya çəngəlində lokal açılmaya məruz qalmış hər iki valideyin DNT zəncirin surəti yeni qız zəncirlərə köçürülür. Nəzəri cəhətdən, vahid bir mənşədən (origindən) başlayan DNT replikasiyası bir replikasiya çəngəli ilə bir istiqamətdə davam etməlidir. Alternativ olaraq, bir mənşədən iki replikasiya çəngəli toplana bilər və sonra əks istiqamətlərdə hərəkət edərək hər iki qız zəncirin *ikisitiqamətli uzunamasına* səbəb ola bilər. Bir sıra müxtəlif tipli eksperimentlər, o cümlədən Şəkil 5-31-də göstərilən eksperiment zəncirlərin ikiistiqamətli uzunamasını sübut edən ilkin dəlilləri təqdim etdi.



ŞƏKİL 5-30 SV40 DNT replikasiya çəngəlinin modeli. (a) Böyük heksamer T-antigen, virus zülalı helikaza kimi fəaliyyət göstərərək valideyin DNT zəncirlərini bir-birindən ayırır. Aparıcı zəncir DNT polimeraza ε (Pol-ε) vasitəsilə replikasiya çəngəlinə qədər uzanır. Pol-ε iki-zəncirli qız DNT-ni əhatə edən PCNA həlqəsinə elə birləşir ki, Pol-ε-PCNA kompleksi replikasiya çəngəli ilə stabil birləşmiş vəziyyətdə qalır. Gecikən-templeyt zəncirin T-helikaza antigeni ilə yaradılmış bir-zəncirli rayonu heterptrimer RPA zülalın çoxsaylı nüsxələri ilə birləşir. Gecikən zəncirin sintezi üçün praymerlər (RNT qırmızı, DNT açıq yaşıl) praymeaza və DNT polimeraza α (Pol-α) kompleksi ilə sintez olunur. Pol-α-praymeaza vasitəsi ilə sintez olunan hər bir praymerin 3′ sonluğu sonra PCNA-Pol-δ kompleksi ilə birləşir, bu kompleks praymeri uzunadır və Okazaki fraqmentlərinin əsas hissəsini sintez edir. (b) SV40 T-antigenin helikaza domeni heksamer replikativ helikazanı əmələ gətirir. Subvahidlər bir-birini əvəz edən ardıcıl açıq və tünd narıncı rənglərlə verilmişdir. (c) DNT polimeraza ε-un modeli aparıcı zəncirin 3′ sonluğunu uzunadır. (d) PCNA-in sarı rəngin müxtəlif kölgələri ilə göstərilmiş üç subvahidi ortasında deşik olan dairəvi quruluşu əmələ gətirir, bu deşikdən ikiqat-zəncirli qız DNT zənciri keçir. (e) Pentamer "tutqac yükləyicisi (clamp loader)" RFC (fərqli yaşıl kölgələrlə göstərilmişdir) dairəvi trimer PCNA "tutqacın" açılmamışdan öncə PCNA ilə birləşmiş şəkildə göstərilmişdir. (f) RPA-in böyük subvahidi bir-zəncirli DNT ilə birləşən iki domenə malikdir. Qeyd edək ki, tək DNT zənciri optimal konformasiyada Poli δ ilə replikasiya etmək üçün orientasiya edən əsaslarla uzanır. Bax M. O′Donnell, L. Langston, and B. Stillman, 2013, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **5**:a010108. [(b) hissə verilənlər D. Li et al., 2003, *Nature* **423**:512, PDB ID 1n25. (c) hissə verilənlər M. Hogg et al., 2014, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**:49, PDB ID 4m8o. (d) hissə verilənlər J. M. Gulbis et al., 1996, *Cell* **87**:297, PDB ID 1axc. (e) hissə verilənlər G. D. Bowman, M. O′Donnell, and J. Kuriyan, 2004, Nature **429**:724, PDB ID 1sxj. (f) hissə verilənlər A. Bochkarev et al., 1997, *Nature* **385**:176, PDB ID 1jmc.]

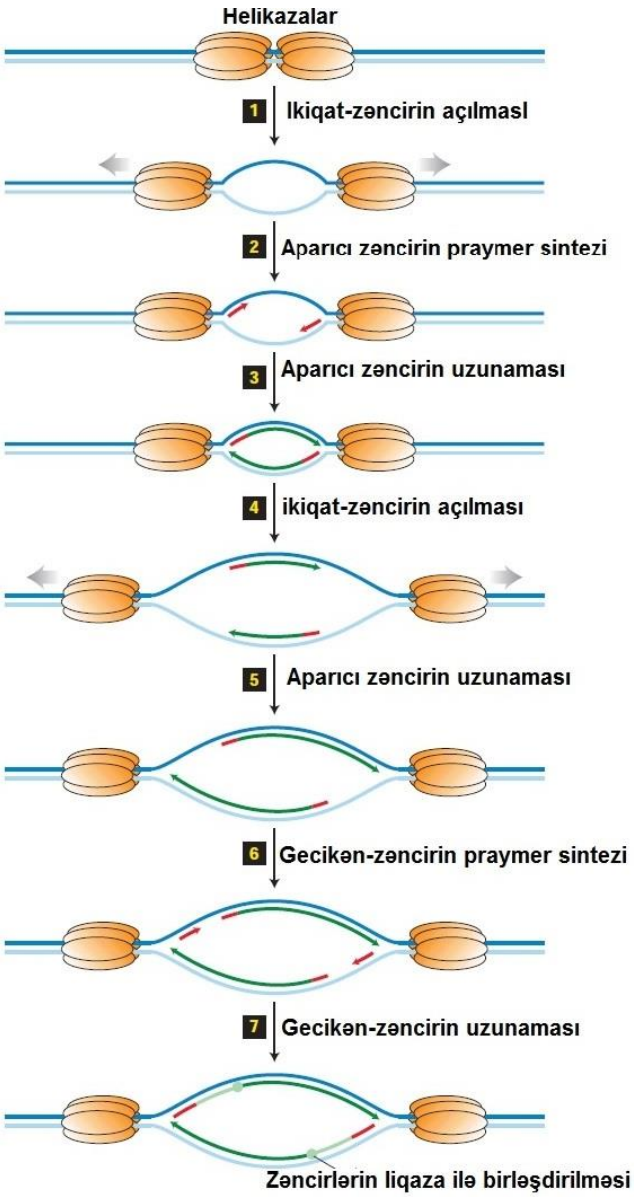
Ümumi konsensus ondan ibarətdir ki, bütün bakterial, arxeal və eukariot hüceyrələri DNT-nin replikasiyasında ikiistiqamətli mexanizmdən istifadə edirlər. SV40 DNT ilə olan halda, replikasiya iki böyük T-antigen heksamer helkazanın vahid bir SV40 mənşəyinə birləşməsi və iki replikasiya çəngəlini əmələ gətirməsi üçün başqa zülalların toplanması ilə inisiasiya olunur. Bunlar sonra, SV40 mənşədən əks istiqamətlərdə uzaqlaşırlar, aparıcı və gecikən zəncirlərdə sintez hər iki çəngəldə baş verir. Şəkil 5-32-də göstərildiyi kimi, soldakı replikasiya çəngəli DNT sintezini sol tərəfə gedən istiqamətdə uzadır; buna bənzər olaraq sağ replikasiya çəngəli isə DNT sintezini sağa olan istiqamətdə uzadır.

SV40 DNT-dən fərqli olaraq, eukariotlarda xromosomal DNT molekulları bir-birindən onlarla və ya yüzlərlə kilo əsaslar məsafədə ayrılmış çoxsaylı replikasiya mənşələrinə malikdirlər. Mənşəni tanıyan kompleksin *ORC* (*o*rigin *r*ecognition *c*omplex) adlanan altı subvahidli zülalı hər bir mənşəyə birləşir və hüceyrənin altı homoloji *MCM* zülallardan təşkil olunmuş və heksamer helikazaları yükləmək üçün tələb olunan başqa zülallar ilə assosasiya edir. İki bir-birinin əks istiqamətində yerləşən MCM helikazalar mənşədə valideyin zəncirləri bir-birindən ayırırlar, nəticədə əmələ gəlmiş bir-zəncirli DNT-yə RPA zülallar birləşirlər. Praymerlərin sintezi və hüceyrə DNT-sinin replikasiyasının sonrakı mərhələləri güman olunur ki, SV40 DNT replikasiyasına analojidir (bax Şəkil 5-31 və 5-32).



EKSPERIMENTAL ŞƏKİL 5-31 SV40 DNT-də ikiistiqamətli replikasiya. Replikasiyası edən SV40 DNT-nin elektron mikroskopiyası DNT zəncirlərinin mənşədən ikiistiqamətli uzunamasını göstərir. SV40-yoluxmuş hüceyrələrdən replikasiya olunan virus DNT-si dairəvi virus DNT-də yalnız bir saytı tanıyan *Eco*RI restriksiya fermenti ilə kəsilir. Bu, SV40 genomunda xüsusi ardıcıllığı tanıyan nişanlama kimi edilmişdir: indi *Eco*RI-i tanıyan ardıcıllq elektron mikroskopu ilə xətti DNT-nin sonluğuna baxılanda asanlıqla tanına bilir. *Eco*RI kəsiyin, replikasiya olunan SV40 DNT molekullarının elektron mikrofotoları kifayət qədər uzunamış replikasiya kopüyünə malik olan kəsilmiş molekulların kolleksiyasını göstərdi, replikasiya "köpüklərinin" mərkəzi kəsilmiş molekulların hər iki ucundan konstant məsafədədir. Bu kəşf, şəkildə göstərildiyi kimi, "köpüyün" ortasında yerləşən ümumi mənşədən başlayan zəncirin iki istiqamətdə uzunaması ilə uyğun gəlir. Bax G. C. Fareed et al., 1972, *J. Virol.* **10**:484. [Mikrofoto Amerikanın Mikrobioloji-Jurnallar Cəmiyyətinin razılı ilə *Journal of Virology*, Fareed et al., 10, 3, 1972-dən yenidən çap olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc. vasitəsilə alınmışdır.]

Hüceyrə DNT-nin replikasiyası və hüceyrə proliferasiyasına aparan başqa hadisələr sıx şəkildə elə tənzimlənməlidir ki, hər bir toxumanı təşkil edən müvafiq sayda hüceyrə, embrional inkişaf dövründə və orqanizmin bütün həyatı boyu istehsal olunsun. İnisiasiya mərhələsi üzərində nəzarət hüceyrədə DNT replikasiyasının tənzimlənməsinin ilkin mexanizmidir. Hüceyrədə DNT replikasyasını inisiasiya etmək üçün tələb olunan MCM helikaza fəaliyyətinin fəallaşdırılması, spesifik proteinkinaza (*DDK*) ilə tənzimlənir, o isə öz növbəsində S-faza *tsiklindən-asılı olan kinaza* adlandırılan xüsusi proteinkinazalarla tənzimlənir. Başqa tsiklindən-asılı olan kinazalar hüceyrə proliferasiyasının başqa aspektlərini, o cümlədən eukariotik hüceyrələrin bölünərək iki qız hüceyrəni əmələ gətirdiyi mitozu tənzimləyirlər. Mitoz və hüceyrənin meyoz adlandırılan başqa xüsusi bölünmə forması, hansı ki, haploid yumurta və sperma (toxum) hüceyrələrini əmələ gətirir, Fəsil 6-da müzakirə olunur. Biz, hüceyrənin bölünmə sürətini müəyyən edən müxtəlif tənzimləyici mexanizmləri Fəsil 19-da müzakirə edirik.



ŞƏKİL 5-32 DNT replikasiyasının ikistiqamətli mexanizmi. Buradakı sol replikasiya çəngəli Şəkil 5-30-da çəkilmiş replikasiya çəngəli lə müqayisə oluna bilər, orada da böyük T-antigenlə yanaşı digər zülallar göstərilir. *Yuxarıda*: İki böyük T-antigen heksamer helikazalar birinci əks istiqamətlərdə replikasiya mənəyinə bağlanırlar. Pillə 1: ATP hidrolizindən yaranan enerjidən istifadə etməklə helikazalar əks istiqamətlərdə hərəkət edərək valideyin DNT zəncirlərini ayırırlar və RPA zülallarla birləşmiş bir-zəncirli DNT templeytı yaradırlar. Pillə 2: Praymeaza - Pol-α kompleks ayrılmış valideyin templeyt zəncirlərlə əsas cütü əmələ gətirən qısa praymerləri sintez edirlər (qırmızı), Pillə 3: Hər bir replikasiya çəngəlində, PCNA-Rfc-Pol-δ/ε kompleksi praymeaza-Pol-α kompleksini əvəz edir və aparıcı zənciri yaratmaqla (tünd yaşıl) qısa

praymeri uzunadır. Pillə 4: Helikaza valideyin zəncirləri ayırmaqda davam edir və RPA zülallar da yeni əmələ gəlmiş bir-zəncirli DNT nahiyəsinə birləşirlər. Pillə 5: PCNA-Rfc-Pol-δ komplekslər aparıcı zənciri uzunatmaqda davam edirlər. Pillə 6: Praymeaza Pol-α komplekslər hər bir replikasiya çəngəlində gecikən zəncirin sintezi üçün praymerləri sintez edirlər. Pillə 7: PCNA-Rfc-Pol-δ komplekslər Praymeaza Pol-α komplekslərini əvəz edirlər və gecikən zəncirin Okazaki fraqmentlərini (açıq yaşıl) uzunadırlar, o isə sonda, liqazalarla aparıcı zəncirlərin 5′ sonluğuna birləşirlər. Liqsiyanın baş verdiyi yer dairə ilə göstərilmişdir. Replikasiya, valideyin zəncirləri daha da açmaqla, pillə 4-7-də olduğu kimi, aparıcı və gecikən zəncirləri sintez etməklə daha da davam edir. Baxmayaraq ki, aydınlıq üçün zəncirlərin açılması və aparıcı və gecikən zəncirlərin sintezi fərdi pillələr kimi göstərilir, amma onlar eyni zamanda baş verirlər.

5.5 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

DNT replikasiyasıı

- Dupleks valideyin DNT-də hər bir zəncir qız zəncirin sintezi üçün templeyt rolunu oynayır və yeni sintez olunmuş zəncirlə əsas cütü əmələ gətirərək qız dupleks zəncirləri yaradırlar (yarımkonservativ mexanizm). Yeni zəncirlər 5′→3′ istiqamətində formalaşır.
- Replikasiya mənşə (origin) adlanan ardıcıllıqdan başlayır. Hər bir eukariot xromosom DMT molekulu çoxsaylı replikasiya mənşəyinə malikdir.
- RNT polimerazadan fərqli olaraq DNT polimeraza duleks DNT zəncirlərini açа bilmir və templeyt zəncirə komplementar olan yeni zəncirin sintezini başlaya bilmir.
- Replikasiya çəngəlində, bir qız zəncir (aparıcı zəncir) fasiləsiz uzanır (elonqasiya edir). Başqa qız zəncir (gecikən zəncir), hər bir-neçə yüz nukleotiddən bir praymerlərdən sintez olunaraq fasilələrlə ardıcıl düzülmüş Okazaki fraqmentlərini əmələ gətirirlər (Şəkil 5-29).
- Hər bir Okazaki fraqmentinin 5′ sonluğunda ribonukleotidlər uzaqlaşdırılır və onlar növbəti Okazaki fraqmentinin 3′ sonluğunu elonqasiya etməklə əvəz olunur. Sonda bir-birinə yaxın olan Okazaki faqmentləri DNT liqaza vasitəsi ilə birləşdirilir.
- Helikazalar, ilkin olaraq çoxnüsxəli bir-zəncirli DNT-birləşdirən RPA zülallarla birləşmiş valideyin (templeyt) DNT zəncirlərini bir-birindən ayırmaq üçün ATP hidrolizindən alınan enerjidən istifadə edirlər. Praymeaza, matrisa DNT-yə əsas cütləri ilə birləşmiş qısa RNT praymerləri sintez edir. Bu, praymer əvvəlcə 3′ sonluqda DNT polimeraza-α (Pol-α) vasitəsi ilə uzanır, nəticədə qısa (5′)RNT-(3′)DNT qız zəncirlər əmələ gəlir.
- Eukariot hüxeyrələrdə DNT-nin çoxu Pol δ və Pol ε ilə sintez olunur, onlar Pol α-dan nisbətən üstünlüyə malik olub qız zəncirlərin uzanmasını (elonqasiyasını) 5′→3′ istiqamətdə davam etdirirlər. Gecikən zəncirin uzunluğunun əsas hissəsini Pol δ sintez edir, Pol ε aparıcı zənciri bütövlükdə sintez edir. Pol δ və Pol ε qız dupleks DNT-ni əhatə edən və sürüşkən tutqac (sliding clamp) rolunu oynayan trimer zülal PCNA ilə birləşərək templeyt zəncirdə stabil birləşmiş şəkildə qalırlar (bax Şəkil 5-30).
- DNT replikasiyası əsasən ikiistiqamətli mexanizmlə, eyni mənşədən başlayan və əks istiqamətlərdə hərəkət edən iki replikasiya çəngəli ilə baş verir və hər bir çəngəldə hər iki templeyt zəncirin nüsxəsi sintez olunur (bax Şəkil 5-32).
- MCM helikaza eukariot DNT replikasiyasını in vivo xromosomal DNT boyunca yerləşmiş çoxsaylı mənşələrdə inisiasiya edir. Eukariotik DNT-nin sintezi bu helikazaların birləşməsinə və faallığına nəzarətlə tənzimlənir.

5.6 DNT-nin Reparasiyası və Rekombinasiyası

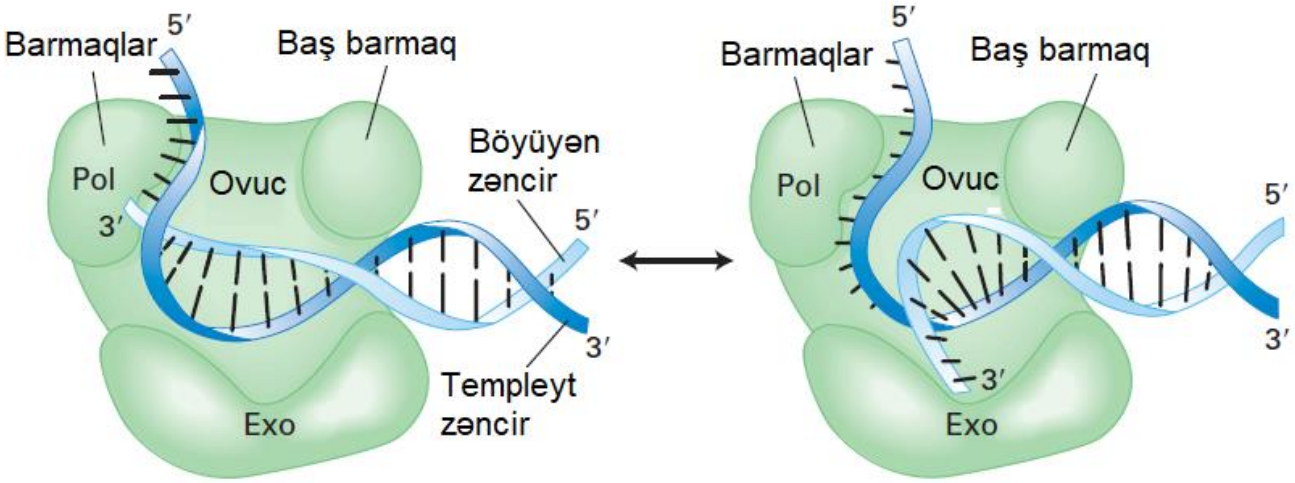
DNT-nin zədələnməsi qaçılmazdır və bu, çoxsaylı müxtılif yollarla baş verir. DNT-nin zədələnməsi DNT molekulunda kimyəvi əlaqələrin spontan qırılması yolu ilə, ultrabənövşəyi işıq (UV) və ionlaşdırıcı radiasiya kimi ətraf mühitin amillərinin təsiri ilə və normal hüceyrə metabolizminin məhsullarından əmələ gələ bilən və ya ətraf mühitdə yaranan geno-toksik kimyəvi maddələrin təsiri ilə baş verə bilir. Normal DNT ardıcıllığında baş verən, **mutasiya** adlanan dəyişilmə replikasiya zamanı DNT polimerazanın zədələnmiş DNT templeyti oxuyarkən səhv nukleotidləri əlavə etməsi yolu ilə yarana bilir. Həmçinin, aşağı tezlikdə mutasiya, DNT polimerazanın zədələnməməş templeytdə replikasiyanı apardığı zaman əmələ kətirdiyi səhvlərin surətinin köçürülməsi nəticəsində də meydana gəlir. Əgər belə mutasiyalar düzəlişsiz qalarsa, yəqin ki, hüceyrədə o qədər mutasiya toplanardı ki, onlar daha normal fəaliyyət göstərə bilməzdilər. Bundan başqa, rüşeyim hüceyrələrindəki DNT, həyat qabliyyətli nəsli formalaşdırmaq üçün həddən çox olan mutasiyalara məruz qala bilər. Beləliklə, DNT ardıcıllığındakı səhvlərin qarşısının alınması bütün tip hüceyrələrdə sağ qalmaq üçün çox vacibdir və hüceyrədə zədələnmiş DNT-nin reparasiyası və ardıcıllıqdakı səhvlərim düzəlişi üçün bir sıra hüceyrə mexanizmləri yaranıb inkişaf etmişdir. Belə mexanizmlərdən biri, ikiqat-zəncirli DNT qırılmalarının rekombinasiya prosesi ilə bərpası eukariot hüceyrələr tərəfindən, rüşeyim hüceyrələrinin yaranması zamanı (sperma və yumurta hüceyrələri) xromosom seqmentlərinin mübadiləsi yolu ilə hər bir xromosomda olan ana və ata genlərinin yeni kombinasiyasının yaranmasında da istifadə olunur, bu proses *genetik rekombinasiya* kimi məlumdur.

Qeyd etmək vacibdir ki, DNT-nin reparasiyası mexanizmindəki qüsurlar və xərcəng xəstəliyi sıx şəkildə bir-biri ilə bağlıdır. Reparasiya mexanizmində güzəştlər edildiyi zaman, hüceyrə DNT-sində mutasiyalar toplanır. Əgər bu mutasiyalar hüceyrə bölünməsinin diqqətli tənzimlənməsində iştirak edən genlərə təsir edərsə, onda bir qayda olaraq, hüceyrələr nəzarət olumayan dərəcədə bölünməyə başlayar, şişin formalaşmasına və xərçəngin yaranmasına səbəb olardı. Fəsil 24, xərçəngin DNT reparasiyasındakı qüsurlardan necə yarandığı mexanizminin dərin izahını əhatə edir. Biz bu bölmədə bir neçə nümunə ilə də rastlaşacağıq, burada əvvəlcə biz DNT-nin toxunulmazlığında baş verə bilən güzəştlərin yollarını, sonra da, hüceyrələrin çox həmiyyətli olan bu molekulun dəqiqliyini təmin edən mexanizmləri inkişaf etdirərək onların bərpası (reparasiya) mexanizmlərini müzakirə edirik.

DNT Polimerazalar Köçürmələrdə Səhvlər Buraxır və Onları Düzəldir

Mutasiyanın qarşısını alan ilk müdafiə xətti DNT polimerazanın özüdür. Templeyt DNT boyunca replikasiya edən DNT polimeraza (Pol δ və Pol ε) fəaliyyət göstərərkən hərdən səhv nukleotidi qız zəncirin uzunamaqda olan 3′ sonluğuna əlavə edir. Məsələn, *E.coli*-nin DNT polimerazası təxminən hər 10^4 (on min) polimerləşmiş nukleotiddən bir səhv nukleotid birləşdirir. Amma, bu vaxta qədər ölçülmüş mutasiya dərəcəsi bakteriyal hüceyrələrdə bu rəqəmdən çox aşağı olub: uzunayan (polimer) zəncirdə təxminən hər 10^9 (on million) nukleotiddən biri səhv olmuşdur. Kifayət qədər yüksək olan bu dəqiqlik əsasən *E.coli* DNT polimerazasının ***doğruluğun-oxuması*** qabliyyəti ilə həyata keçirilir. Eukariotlarda Pol-δ və Pol-ε eyni mexanizmi həyata keçirirlər.

Doğruluğun-oxuması bəzi DNT polimerazaların 5′→3′ *eqzonukleaza fəallığından* asılıdır. DNT sintezi zamanı zəncirə səhv nukleotid birləşərsə, o zaman yeni sintez olunan zəncirin 3′ nukleotidi templeyt zəncirlə əsas cütü əmələ gətirə bilmir. Nəticədə, DNT polimeraza fasilə edir və uzunamaqda olan zəncirin 3′ sonluğunu eqzonukleaza saytına keçirir və orada səhv birləşmiş nukleotidi əsas zincirdən ayırıb uzaqlaşdırır (Şəkil 5-33). Sonra 3′ sonluq yenidən geriyə, polimeraza saytına keçirilir və bu nahiyə yenidən düzgün köçürülür. *E.coli*-nin hər üç DNT plomerazası doğruluğun-oxuması fəallığına malikdir, eləcə də heyvan hüceyrələrinin çoxunda eukariot δ və ε DNT polimerazalari xromosom DNT-sinin replikasiyası zamanı belə edir. Görünür, doğruluğun-oxuması bütün hüceyrələrə hədsiz dərəcədə çox mutasiyalardan uzaq olmaq üçün lazımdır.

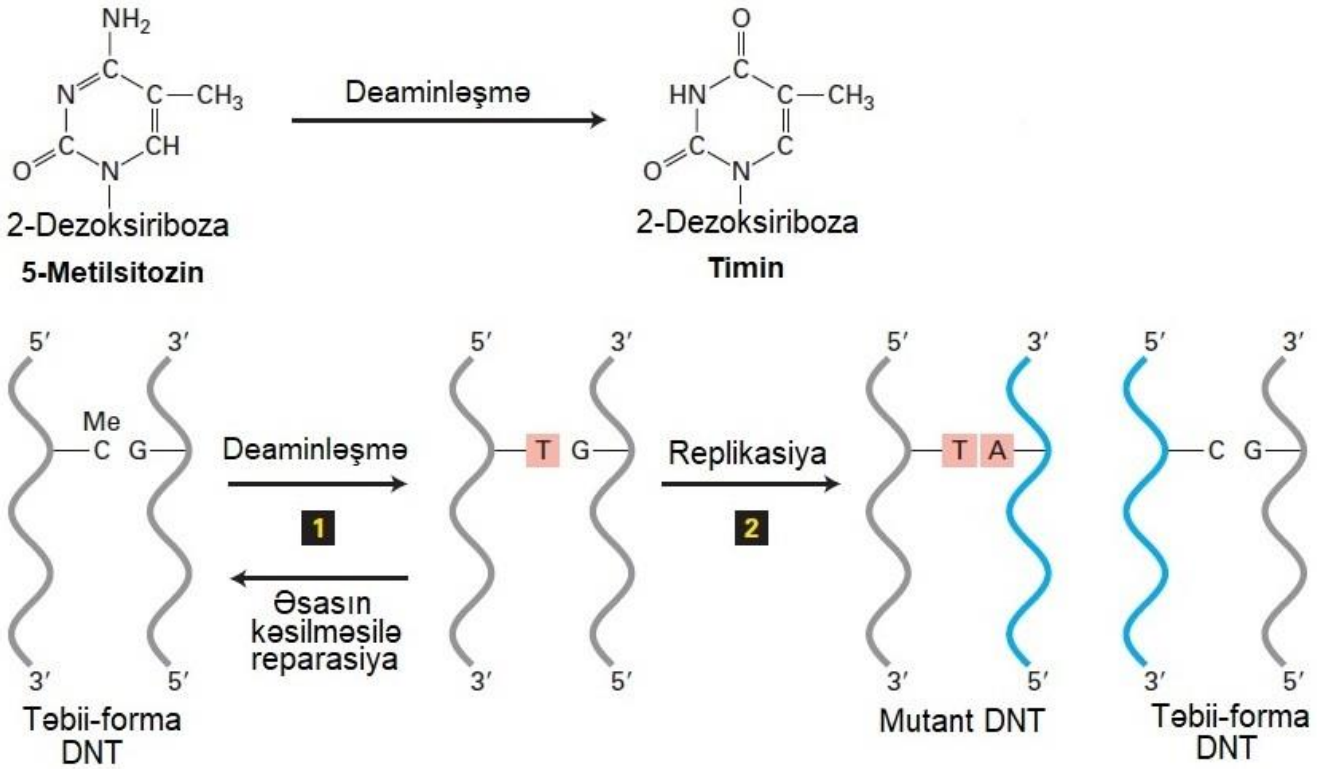


ŞƏKİL 5-33 DNT polimeraza ilə doğruluğun-oxuması (proofreading). Bütün DNT polimerazalar, yarımaçılmış sağ ələ bənzər, oxşar üç-ölçülü quruluşa malikdirlər. Barmaqlar templeyt zəncirin bir-zəncirli seqmentinə birləşirlər, və katalitik polimeraza (Pol) fəallığı barmaqlarla ovucun qovuşduğu nahiyədə yerləşir. Uzunayan zəncirin 3′ sonluğuna düzgün nykleotidlərin əlavə olunduğu müddətdə o polimeraza saytında qalır. Zəncirin 3′ sonluğuna səhv nukleotidin birləşməsi ikiqat zəncirin yeni formalaşmış sonluğunun əriməsinə səbəb olur. Nəticədə polimeraza fəallığı fasilə verir və uzunayan zəncirin 3′ sonluğu, 3 nm kənarda olan 3′→5′ eqzonukleaza saytına keçir (Exo), burada səhv birləşmiş əsas və yəqin ki, başqa əsaslar da zəncirdən ayrılıb atılır. Sonra, 3′ sonluq geriyə, polimeraza saytına keçirilir və zəncirin elonqasiyası davam edir. Bax C.M. Joyce and T.T. Steitz, 1995, *J.bacteriol*, 177:6321, və S.Bell and T.Baker, 1998, *Cell*, 92:295.]

DNT-də Kimyəvi və Radiasiya Zədələnmələri Mutasiyalar Yarada Bilir

DNT fasiləsiz şəkildə zədələyici kimyəvi reaksiyaların təsirinə məruz qalır, bir insan hüceyrəsi civarında hesablanmış DNT zədələnməsinin sayı bir gün ərzində 10^4-dən 10^9-a qədər olur. Hətta DNT zədələyici kimyəvi maddələrin təsirinə məruz qoyulmadıqda belə DNT quruluşunun müəyyən aspektləri irsən qeyri stabildir. Məsələn, purin əsasını dezoksiribozaya birləşdirən əlaqə fizioloji şəraitin təsiri altında aşağı sürətdə hidroliz olunmağa meyillidir və nəticədə şəkər qalığını əsasa birləşməmiş vəziyyətdə buraxır. Beləliklə, kodlaşdırıcı informasiya itir və bu DNT-nin replikasiyası zamanı mutasiyaya səbəb olur. Normal hüceyrə reaksiyaları, o cümlədən mitoxondrilərdə elektronların elektron-nəqliyyat zənciri boyunca hərəkəti və peroksisomlarda lipidlərin oksidləşməsi (bax Fəsil 12) DNT ilə qarşılıqlı əlaqədə olub onu zədələyən bir sıra kimyəvi maddələri, o cümlədən hidroksil radikallarını və superoksidi (O_2^-) yaradırlar. Bu maddələr də mutasiyaya, o cümlədən xərçəngə aparan mutasiyaya səbəb ola bilirlər.

Bir sıra spontan mutasiyalar DNT ardıcıllığında bir əsas cütünün dəyişilməsi ilə əmələ gələn **nöqtəvi mutasiyalar**dır. Bu, stop kodonun vaxtından əvvəl əmələ gəlməsinə və əvəllər müzakirə etdiyimiz kimi ***nonsens mutasiyanın*** yaranmasına səbəb olur və ya kodlaşdırdığı zülalda aminturşu ardıcıllığını dəyişiməklə ***missesns mutasiyanı*** yaradır. ***Susan mutasiya (Silent mutations***) aminturşu ardıcıllığını dəyişmir (məsələn GAG dəyişib GAA olsa da hər iki halda qlutamini kodlaşdırır). Nöqtəvi mutasiyalar DNT-nin zülal kodlaşdırmayan ardıcıllığında da ola bilir, bu ardıcıllıqlar, Fəsil 9-da müzakirə olunduğu kimi genlərin transkripsiyasının tənzimlənməsində iştirak edirlər. Ən çox rast gəlinən nöqtəvi mutasiyalardan biri sitozin əsasının (C) ***deaminləşmə***si ilə baş verir və onu urasil (U) əsasına çevirir. Başqa bir deaminləşmə çox rast gəlinən modifikasiya olunmiş əsas, 5-metil sitozin deaminləşdikdə timinə (T) çevrilir. Əgər bu dəyişikliklər DNT replikasiyasından



ŞƏKİL 5-34 Deaminləşmə (aminsizləşmə) nöqtəvi mutasiyaya səbəb olur. Spontan nöqtəvi mutasiya 5-metilsitozinin (C) aminsizləşərək timinə (T) keçməsi yolu ilə əmələ gəlir. Əgər, əmələ gəlmiş T·G əsas cütü əsasların-kəsilməsi mexanizmi ilə (pillə 1) əvvəlki normal C·G əsas cütünə bərpa olunmazsa o, növbəti DNT replikasiyası zamanı (pillə 2) ardıcıllıqda daimi dəyişikliyə gətirib çıxaracaq (mutasiyaya səbəb olacaq). Bir replikasiya dövrəsindən sonra qız DNT-lərdən biri mutant T·A əsas cütünə və digəri isə təbii C·G əsas cütünə malik olacaqdır.

əvvəl düzgün vəziyyətə gətirilməzsə, hüceyrə tərkibində U və ya T olan zənciri templeyt kimi U-A və ya T-A əsas cütləri yaratmaq üçün istifadə edəcək və DNT ardıcıllığında daimi dəyişilmənin yaranmasına səbəb olacaq (Şəkil 5-34).

Yüksək Dəqiqliklə DNT Kəsilməsi-Reparasiya Sistemləri Zədələri Tanıyıb Bərpa Edir

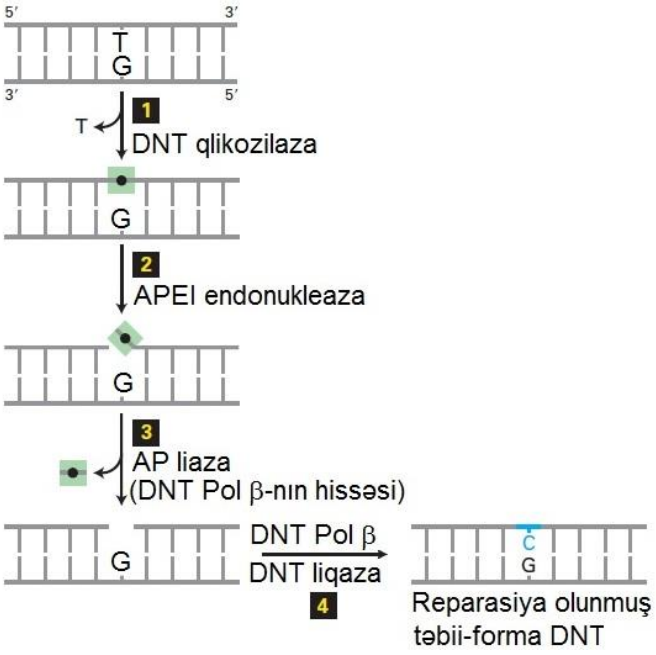
Hüceyrələr, doğruluğun-oxunmasından əlavə, köçürmə zamanı baş verən səhvlərdən, kimyəvi maddələrələ və radiasiyaya məruz qalmaqla əmələ gələn mutasiyaların qarşısını almaq üçün də başqa təmir sistemlərinə malikdirlər. Normal halda son dərəcə yüksək dəqiqliklə fəaliyyət göstərən, DNT-də bir sıra **kəsiklərin-bərpası sistemləri** (DNA excision-repair systems) çox yaxşı öyrənilmişdir. İlk əvvəl bu sistemlər, *E.coli*-də biokimyəvi və genetik tədqiqatların kombinasiyası yolu ilə öyrənilmişdir. Əsas bakterial zülalların homoloqları maya göbələyindən insana qədər bütün eukariotlarda da mövcuddur, bu göstərir ki, səhvlərdən-azad mexanizm təkamülün başlanğıcında DNT-nin bütövlüyünü, toxunulmazlığını qoruyub saxlamaq üçün yaranıb inkişaf etmişdir. Bu sistemlərin hər biri oxşar tərzdə fəaliyyət göstərir – zədələnmiş DNT zəncirinin seqmenti kəsilib atılır və əmələ gələn boşluq komplementar DNT zəncirini templeyt kimi istifadə etməklə DNT polimeraza və liqaza vasitəsi ilə doldurulur.

İndi biz, bir əsasda olan mutasiyanın reparasiyasından başlayaraq hər iki zəncir boyu qırılmış DNT zədələnmələrinin bərpasına qədər DNT reparasiyasının bəzi mexanizmləri ilə daha yaxından tanış olacağıq. Bunlardan bəzilərinin bərpası yüksək dəqiqliklə, bəzilərininki isə az dəqiqliklə həyata keçir.

Əsasların Kəsilməsi T-G Uygunsuzluğunu və Zədələnmiş Əsasları Təmir Edir

İnsanda, ən çox rast gəlinən nöqtəvi mutasiya, 5-metil sitozinin deaminləşərək timinə çevirilməsi ilə baş verən C-dən T-ə mutasiyadır (bax Şəkil 5-34). ***Əsasların kəsilməsi ilə reparasiyada*** konseptual problem ondan ibarətdir ki, hansı DNT zəncirinin normal, hansının isə mutant zəncir olduğu təyin edilsin, və sonuncunu elə təmir etməli ki, o normal zəncirlə düzgün əsas cütü əmələ gətirsin. Amma, bir halda ki, G·T uyğunsuzluğu, demək olar dəyişməz şəkildə, C-nin U-ya kimyəvi çevrilməsi ilə əmələ gəlmişdir və ya 5-metil C-dən T əmələ gəlmişdir, ona görə də reparasiya sistemi T-ni çıxarıb C ilə əvəz etmək üçün yaranıb inkişaf etmişdir.

DNT qlikozilaza G·T uyğunsuzluğu tanıyır və timin əsasını ehmalca zəncirdən çıxarır, sonra da onu DNT-nin şəkər-fosfat özülünə birləşdirən əlaqələri hidroliz edir. Bu ilkin kəsilmənin ardınca, APE1 (**apurin**) adlanan endonukleaza DNT zəncirini yeni əsassız (abasic) sayta yaxın nahiyədən kəsir. Əsassız qalmış dezoksiriboza fosfat sonra atılır və xüsusi reparasiya DNT polimerazası templeyt zəncirindəki G-ni oxuyaraq onu C ilə əvəz edir (Şəkil 5-35).



ŞƏKİL 5-35 T-G uyğunsuzluğun əsas kəsilməsi ilə reparasiyası. Adətən 5-metil C qalığında deaminləşmə hesabına əmələ gələn T·G uyğunsuzluqlar (bax Şəkil 5-34) üçün spesifik olan DNT qlikozilaza timin əsasını spiraldan vurub çıxarır sonra da onu şəkər-fosfor özülündən kəsib atır (pillə 1), qalan yalnız dezoksiriboza olur (qara nöqtə). Nəticədə əmələ gəlmiş əsassız sayta spesifik olan endonukleaza (apurin endonukleaza-1, APE1) sonra DNT özülünü kəsir (pillə 2) və dezoksi riboza-fosfat, reparasiyada istifadə olunan xüsusi DNT polimeraza olan DNT polimeraza-β ilə assosasiyada olan endonukleaza apurin liaza (AP liaza) vasitəsi ilə uzaqlaşdırılır (pillə 3). Sonra, boş qalmış yer DNT polimeraza-β ilə doldurulur və zəncir DNT liqaza vasitəsi ilə birləşdirilir (pillə 4), nəticədə orjinal G·C əsas cütü bərpa olunur. Bax O.Schärer, 2003, *Angewandte Chemie* 42:2945.

Əvvəllər qeyd olunduğu kimi, bu cütdə səhv əsas T, təbii şəkildə normal DNT-də ortaya çıxdığından reparasiya sistemi DNT-nin replikasiyasından öncə baş verməlidir. Nəticədə, o replikasiya zamanı normal Uotson-Krik əsas cütləri əmələ gətirmək qabliyyətinə malik olacaqdır, bununla da reparasiya mexanizmləri tərəfindən tanına bilməyən stabil nöqtəvi mutasiyanı yaradacaqdır (bax Şəkil 5-34, pillə 2).

İnsan hüceyrələri qlikozilazalar batareyasına malikdirlər, bunların hər biri müxtəlif dəst kimyəvi modifikasiya olunmuş DNT əsaslarına spesifikdirlər. Məsələn, onlardan biri, quaninin oksidləşmiş forması olan 8-oksiquanini uzaqlaşdırır və onun zədələnməmiş G ilə əvəz olunmasına imkan yaradır, başqaları alkilləşdirici agentlərlə modifikasiya olunmuş əsasları uzaqlaşdırır. Nəticədə, əsası itmiş nukleotid sonra, yuxarıda müzakirə olunduğu kimi, reparasiya mexanizmi vasitəsi ilə doğru nukleotidlə əvəz olunur. Buna bənzər mexanizm həmçinin, dezoksiriboza ilə əsaslar arasında olan qlikozil əlaqələrinin hidrolizi nəticəsində adenin və ya quanin əsaslarının DNT-dən itirilməsi kimi baş verən *depurinasiyadan* əmələ gəlmiş zədələnmələrin təmirində də fəaliyyət göstərir. Depurinasiya spontan olaraq baş verir və bütün məməlilər və quşlar üçün ümumi haldır. Əmələ gəlmiş **"əsassız"** saytlar təmir olunmamış qalarsa DNT replikasiyası zamanı onlar mutasiyanı yaradacaqlar, çünki onlar uyğun olan cütləşmiş əsasları tapa bilməyəcəklər.

Uyğun Olmayanın Kəsilməsi Digər Uyğun Olmayanları, Kiçik İnsersiyaları və Delesiyaları Bərpa Edir

Bakteriyadan insana qədər konservativ olan başqa bir proses, başlıca olaraq əsas-cütlərindəki uyğunsuzluğu və replikasiya zamanı DNT polimerazanın təsadüfən əlavə etdiyi bir və ya bir neçə nukleotid uzunluqda insersiyaları və ya delesiyaları aradan qaldırır. T-G uyğunsuzluqda əsasın uzaqlaşdırılması ilə T-nin bərpasında olduğu kimi, ***uyğun olmayanın kəsilməsilə reparasiyası*** üzrə konseptual problem hansı DNT zəncirinin normal və hansının mutant zəncir olmasının təyini və sonuncunun bərpasıdır. Bunun insan hüceyrələrində necə baş verməsi hələ tam məlum deyil. Belə guman olunur ki, DNT-nin uyğun olmayan seqmentləri ilə birləşən zülallar valideyin və qiz DNT zəncirlətrinini bir-birindən fərqləndirir, sonra, qız zəncirdə olan, replikasiyada baş verən səhvin nəticəsində əmələ gəlmiş uyğun olmayan əsas cütlərinin seqmenti kəsilir və templeyt zəncirə komplementar olan dəqiq zəncir bərpa olunur (Şəkil 5-36). Əsasın kəsilməsi ilə reparasiyanın əksinə olaraq, uyğun olmayanın kəsilməsi ilə reparasiya adətən DNT-nin replikasiyasından sonra baş verir.

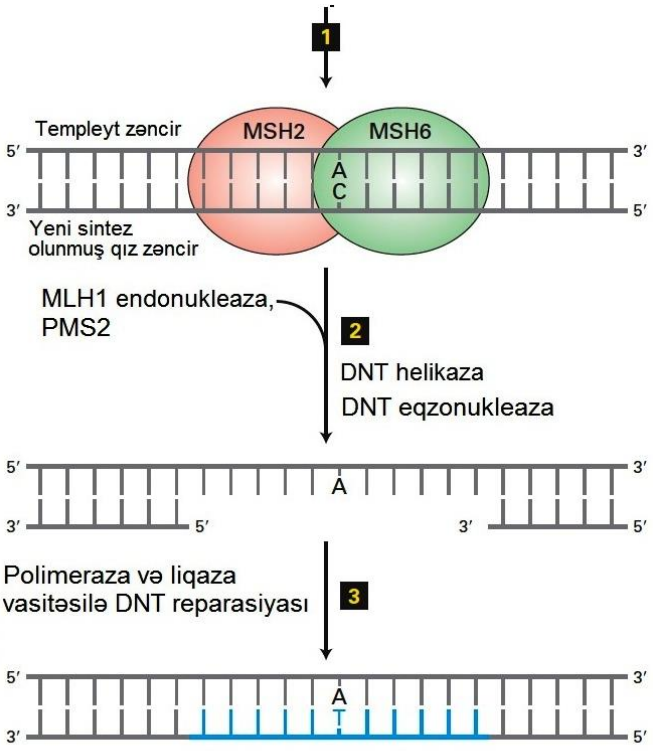
Irsi qeyri-polyposis kolorektal xərçəng kimi tanınan, yoğun bağırsağın xırçənginə meyillilik, *MLH1* və ya *MSH2* genlərdən hər hansı birinin bir nüsxəsində irsən keçmiş funksiyanın-itirilməsi mutasiyası nəticəsində əmələ gəlir. MSH2 və ya MLH1 zülallar DNT-də uyğunsuzluğun (misməç) reparasiyası üçün əhəmiyyətlidir (bax Şəkil 5-36). Bu genlərin hər ikisindən ən azı bir nüsxəsi normal funksional olan hüceyrələr normal uyğunsuzluq reparasiyasına malik olur. Amma şiş hüceyrələri çox vaxt o hüceyrələrdən əmələ gəlir ki, onlarda təsadüfi mutasiya bu genlərin ikinci nüsxəsində də baş verir; bu genlərdən birinin hər iki nüsxəsi qeyri-funksional olanda uyğunsuzluğun reparasiyası sistemi itir. Bu genlərdə fəalsızlaşdırıcı mutasiyalar yoğun bağırsaq xərçənginin çox rast gəlinən qeyri irsi formasıdır.

Nukleotidlərin Kəsilməsi Kimyəvi Maddələrin Təhrif Etdiyi Normal DNT Formasını Bərpa Edir

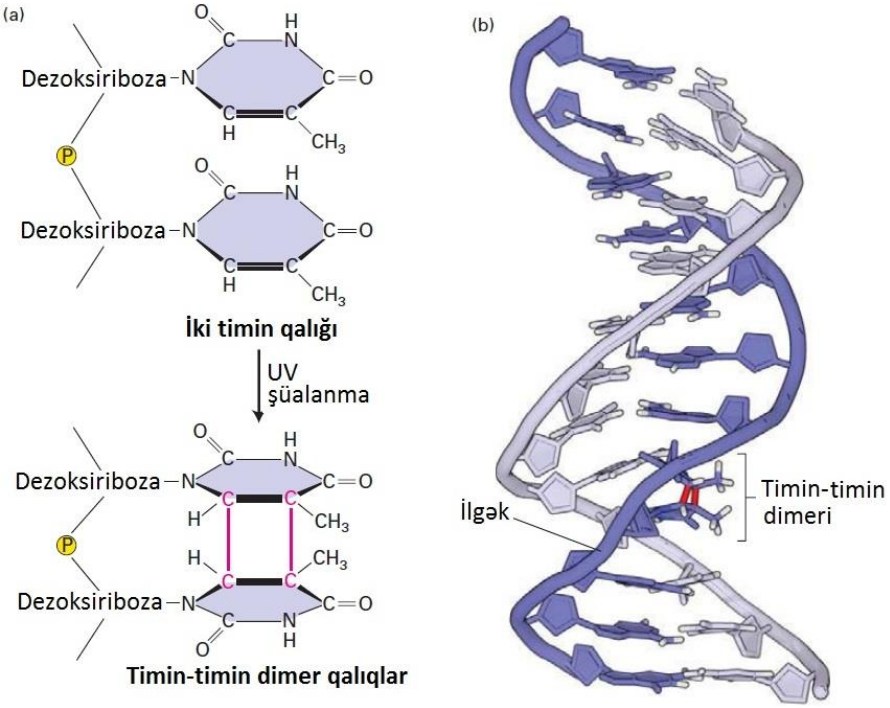
Hüceyrə, ***nukleotid kəsilmələriylə reparasiyadan*** istifadə edərək çox vaxt kimyəvi əddaktlar adlandırılan və DNT-nin normal formasında lokal təhriflərin yaranmasına səbəb olan, kimyəvi maddələrlə modifikasiya olunmuş əsasların olduğu DNT nahiyələrini bərpa edir. Bu cürə təmir üçün, bəzi zülalların ikiqat zəncirli DNT molekulunun səthi boyunca hərəkət edərək (sürünərək) ikiqat zəncirin formasındakı qabarıqları və ya başqa qeyri adı halları axtarmaq qabliyyətinin olmasıdır. Məsələn, bu mexanizm, UV işığın əmələ gətirdiyi ümumi bir zədələnməni ***timin-timin dimerlərini*** təmir edir (Şəkil 5-37), bu dimerlər öz təsirini həm DNT-nin replikasiyasında həm də transkripsiyasında saxlayır. Şəkil 5-38 nukleotid-kəsilməsi ilə təmir sisteminin zədələnmiş DNT-ni necə bərpa etdiyini göstərir.

Nukleotid-kəsilməsi ilə təmir sistemində 30-a qədər zülal iştirak edir, onlardan birincisi xərçəngə meyilliliklə bağlı olan, irsən ötürülən xəstəlik kseroderma piqmentozumlu şəxslərin hüceyrələrindən alınan kultura hüceyrələrində DNT reparasiyasındakı qüsurların öyrənilməsi zamanı tapılmışdır.

Belə xəstələrdə, əgər onlar günəş altında UV şüalarına məruz qalarsa, çox hallarda melanomalar və yastı hüceyrə (squamous cell) karsinomaları adlanan dəri xərçəngi inkişaf edir. Bu təsirə məruz qalmış xəstələr funksional nukleotid kəsilməsiylə təmir sistemindən məhrumdurlar. XP-A-dan XP-G-ə qədər adlandırılan ən azı yeddi müxtəlif gendən istənilən hər hansı birinin mutasiyası bu reparasiya sistemini fəalsızlaşdırır və xəstədə kseroderma piqmentozumun yaramnasına səbəb olur, bu mutasiyaların hamısı eyni fenotipi əmələ gətirir və xəstələr eyni aqibətə malik olurlar. Nukleotid kəsməklə təmir sistemində bu XP zülalların əksəriyyətinin rolu çox yaxşı öyrənilmişdir (bax Şəkil 5-38).

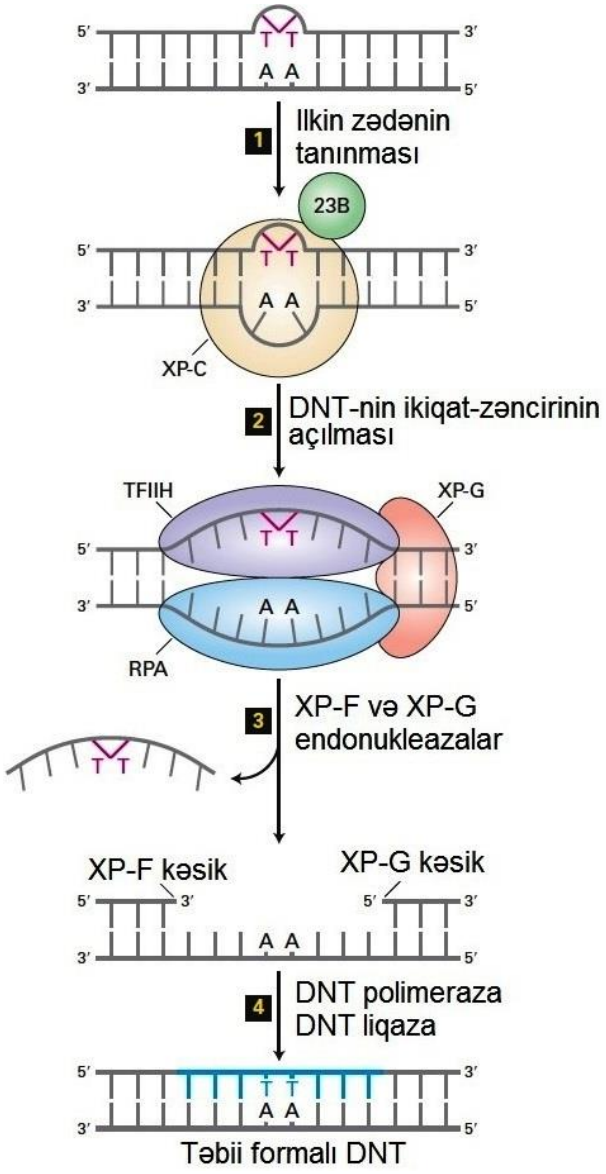


ŞƏKİL 5-36 İnsan hüceyrələrində uyğun olmayanın kəsilməsi reparasiya mexanizmi. Uyğun olmayanın kəsilməsi reparasiya yolu replikasiya zamanı buraxılmış səhvləri düzəldir. MSH2 və MSH6 zülalların kompleksi (bakterial *MutS* homoloq 1 və 6) DNT-də səhv cütləşmiş seqmentə elə birləşir ki, templeyt zəncir ilə yeni sintez olunmuş qız zənciri bir-birindən fərqləndirsin (pillə 1). Bu cürə birləşmə MLH1 və PMS2-nin (hər ikisi bakterial MutL ilə homoloqudurlar) birləşməsinə səbəb olur. Əmələ gəlmiş DNT-zülal kompleksi sonra endonukleaza ilə birləşir, o isə yeni sintez olunmuş qız zəncirini kəsir. Sonra, DNT helikaza zənciri açır, və eqzonukleaza qız zəncirin kəsilmiş ucundan uyğun olmayan əsas da daxil olmaqla bir neçə nukleotidi uzaqlaşdırır (kəsib atır) (pillə 2). Nəhayət sonda, əsasların kəsilməsi ilə reparasiyada olduğu kimi, əmələ gələn boşluq DNT polimeraza ilə doldurulur (indiki halda Pol δ ilə) və zəncir DNT liqaza ilə birləşdirilir (pillə 3).



ŞƏKİL 5-37 Timin-timin dimerinin əmələ gəlməsi. (a) UV şüaların təsiri ilə əmələ gələn ən geniş yayılan DNT zədələnməsi timin-timin dimerlərin yaranmasıdır. (b) Bu yaralanma onların DNT-nin ikiqat zəncirində əmələ gətirdiyi formanı tanıyan kəsilməklə-reparasiya mexanizmi ilə bərpa oluna bilər. (b)-də qırmızı xətt (a)-da göstərilən UV ilə induksiya olunmuş C–C əlaqələridir. [(b) hissəsindəkilər K. McAteer et al., 1998, *J Mol Biol.* **282**:1013, PDB ID 1ttd.]

Maraqlıdır ki, bütün genlərin transkripsiyasında tələb olunan əsas transkripsiya faktoru TFIIH-ın beş polipeptid subvahidi (bax Şəkil 9-19) eukariot hüceyrələrdə nukleotidlərin-kəsilməsi ilə təmir sistemində də tələb olunur. Şəkil 5-38-də göstərildiyi kimi, bu subvahidlərdən ikisi helikaza ilə homolojidir. Transkripsiyada TFIIH-ın helikaza fəallığı start saytında DNT zəncirlərini açır və RNT polimerazaya imkan verir ki, transkripsiyanı inisiasiya etsin (bax Şəkil 9-19). Görünür təbiət helikaza fəallığının tələb olunduğu iki müxtəlif hüceyrə prosesində oxşar zülal komplekslərini istifadə etmişdir.



ŞƏKİL 5-38 İnsan hüceyrələrində nukleotid kəsilməsi ilə reparasiya. İkiqat zəncirin əyilməsinə səbəb olan timin-timin kimi DNT yaralanması XP-C (xeroderma pigmentosum C protein) və 23B zülallar kompleksi tərəfindən tanınır (pillə 1). Bu kompleks sonra TFIIH transkripsiya faktorunu cəlb edir, sonuncunun helikaza subvahidi ATP hidrolizindən alınan enerjidən istifadə edərək ikiqat zənciri qismən ayırır. Sonra, XP-G və RPA zülallar kompleksə birləşirlər və ikiqat zənciri təxminən 25 əsasa qədər daha da ayırıb stabilləşdirirlər (pillə 2). Ardınca, XP-G (indi eqzonukleaza kimi fəaliyyət göstərərək) və XP-F (ikinci endonukleaza) zədələnmiş nahiyənin hər tərəfindən 24-32 nukleotid məsafədə zənciri kəsirlər (pillə 3). Bu kəsilmə tərkibində zədələnmiş əsas(lar) olan DNT fraqmentini buraxır, onlar mononukleotidlərə qədər parçalanırlar. Sonda boş məsafə, DNT polimeraza ilə DNT replikasiyasında olduğu kimi doldurulur və DNT ucları DNT liqaza ilə birləşdirilir (pillə 4). Bax J. Hoeijmakers, 2001, *Nature* 411:366 və O. Schärer, 2003, *Angewandte Chemie* 42:2946.

Transkripsiyada və DNT-nin təmiri sistemlərində ortaq subvahidlərin idtifadə olunması müşahidələri ali eukariotlarda DNT zədələnməsinin nəyə görə genomun transkripsiya olunmayan nahiyələri ilə müqayisədə onun fəal transkriksiya olunan nahiyələrində daha yüksək sürətlə təmir olunduunu, izah etməyə kömək edə bilər – bu fenomen ***transkripsiya ilə bağlı təmir*** (***rearasiya***) adlanır. Ali eukariotların istənilən hər hansı bir hüceyrəsində genomun yalnız kiçik bir hissəsi transkripsiya olunduğundan, transkripsiya ilə bağlı təmir bərpa cəhdlərini səmərəli şəkildə ən çox kritik olan nahiyələrə yönəldir. Bu sistemdə, əgər RNT polimeraza DNT zədələnmələrində (məsələn timin-timin dimerlərində) ilişib dayanırsa, CSA və CSB zülallar kompleksi RNT polimerazaya səfərbər olunur, burada onlar DNT spiralının açılmasına, TFIIH-ın səfərbər olunmasına və Şəkil 5-38-də pillə 2-dən 4-qədər göstərilən reaksiyanın gedişinə təkan verirlər. CSA və CSB nadir hallarda irsən ötürülən və bu zülallardakı mutasiyanın hesabına yaranan "Cocayne" sindromu adlandırılan inkişaf pozğuntularının şərəfinə adlandırılır.

İki Sistem Rekombinasiya Yolu İlə DNT-də İki-Zəncirli Qırılmaları Bərpa Edir

İonlaşdırıcı radiasiya (məsələn, *x*- və γ-radiasiya) və xərçəngə qarşı istifadə olunan bəzi dərmanlar DNT molekulunda ikizəncirli qırılmalara səbəb olur. Bunlar xüsusən sərt zədələnmələrdir, çünki DNT-nin qırılmış ikiqat zəncirinin səhv birləşməsi geniş xromosom yerdəyişmələrinə səbə olur, bu da genlərin funksiyasına təsir edir. Məsələn, səhv birləşmə elə hibrid genləri yarada bilər ki, bu genin aminturşu ardıcıllığının N-sonluq hissəsini kodlaşdıran nahiyəsi tamamilə başqa aminturşu ardıcıllığının C-sonluq hissəsi ilə birləşir, və ya xromosom yerdəyişmələri bir genin promotorunu başqa bir genin kodlaşdırıcı nahiyəsinin çox yaxın hissəsinə gətirir, beləliklə həmin genin ekspressiya səviyyəsinin və ya onun ekspressiya olunduğu hüceyrə tipinin dəyişməsinə səbəb olur.

İki-zəncirli qırıqları bərpa etmək üçüm iki sistem yaranıb inkişaf etmişdir: *homoloqların rekombinasiyası*, növbəti bölmədə müzakirə olunur və hər dəfə bərpa nöqtəsində bir neçə nukleotidi itdiyindən səhvlərə meyilli olan *qeyri-homoloji ucların-birləşməsi* (*nonhomologous end-joining - NHEJ*).

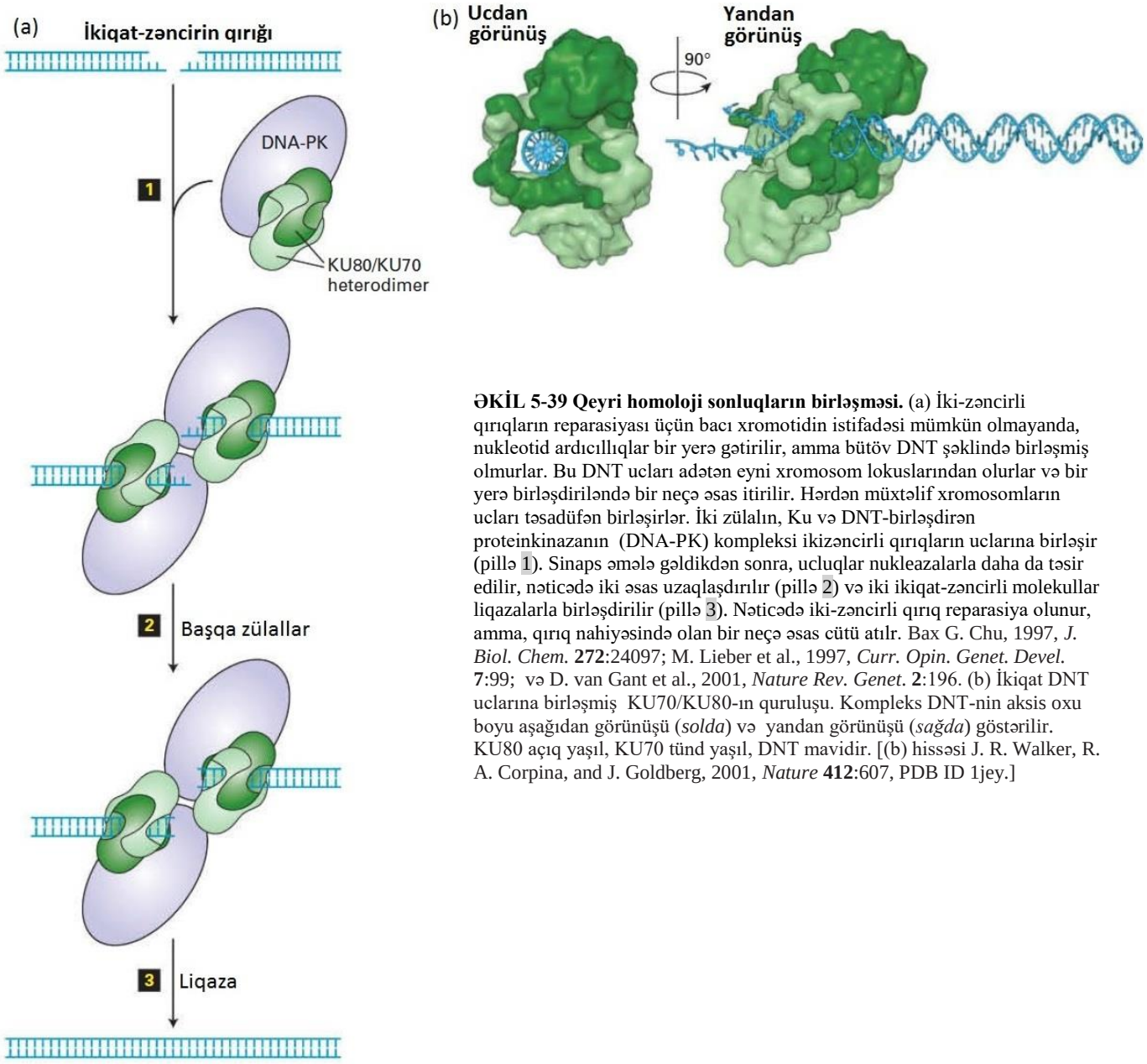
Qeyri-Homoloji Ucların-Birləşməsi Yolu ilə Səhvlərə Meyilli Reparasiya Çoxhüceyrəli orqanizmlərdə iki-zəncirli qırıqların təmiri üçün üstünlük təşkil edəm mexanizm kimi, iki DNT molekulunun qeyi-homoloji sonluqlarının yenidən birləşməsi istifadə olunur. Birləşmiş DNT fraqmentləri hətta eyni xromosomdan gəlsələr də bərpa prosesi birləşmə nöqtəsində bir sıra əsas cütlərinin itirilməsi ilə nəticələnir (Şəkil 5-39). Bu cürə mümkün olan mutagen silinmənin (delesiyanın) formalaşması, DNT zədələnməsi bərpasının mutasiyaya səbəb olmasına aid bir nümunədir.

DNT-nin diffuziyası özlü nüvə plazması daxilində kifayət qədər yavaş olduğundan, qırılan xromosomun düzgün ucları, bir qayda olaraq ucların effektiv olması üçün onların çox uzağa diffuziya etməsindəm öncə, bəzi əsas cütlərini itirilməklə də olsa, yenidən birləşirlər. İnsan genlərinin əksəriyyətinin uzunluğunun əsas hissəsini mRNT-nin prosessinqi zamanı splaysinqlə atılan intronlar təşkil etdiyindən çox hallarda yaranan kiçik silinmələr elə də zərərli olmur. Amma, vaxtdan-vaxta, müxtəlif xromosomlardan qırılmış sonluqlar bir yerə qovuşaraq DNT hissələrinin bir xromosomdan başqasına keçməsinə (translokasiyasına) səbəb olurlar. Belə yerdəyişmələr ximer genlərin yaranmasına səbəb olur, bunlar da hüceyrənin normal funksiyasına təsir edir, hüceyrənin nəzarət oluna

bilməyən artmasına səbə olur, bu da xərşəng xəstəliyinin ilk nişanəsidir (bax Şəkil 8-38). İki-zəncirli qırılmanın dağıdıcı təsiri onları, Şeksperin *Yuli Sezar* haqqında dedikləri ilə desək, "ən arzuolunmayan kəsklər" edir.

Homoloji Rekambinasiya DNT Zədələnmələrini Bərpa Edir və Genetik Müxtəlifliyi Yaradır.

Bir zamanlar belə guman olunurdu ki, homoloji rekombinasiya insan hüceyrələrində kiçik təmir prosesidir. Amma, məlum olanda ki, reparasiyası üçün homoloji rekombinasiyanın vacib olduğu, insanın bir neçə genində irsən keçmiş mutasiya ilə xərçəng xəstəliyi güclənir bu fikir dəyişildi (bax Cədvəl 24-1). Məsələn, süd vəzi xərçənginə tutulmağa irsən keçmiş meyilliliyi olan bəzi qadınlarda, reparasiya sistemində iştirak edın zülalları kodlaşdıran *BRCA-1* və ya *BRCA-2* genlərdən hər hansı birinin allellərindən birində mutasiya baş verir. İkinci allelin itirilməsi və ya fəalsızlaşması homoloji rekombinasiya ilə reparasiya yollarını ingibirləşdirir və beləliklə də döş xərçənginin və ya yumurtalığın epiteli hüceyrələrinin xərçənginin induksiya olunmasına meyillilik yaranır. Maya göbələyi, γ-şüalanma ilə induksiya olunan iki-zəncirli qırılmaları homoloji rekombinasiyadan istifadə etməklə bərpa edə bilir. Belə reparasiya sisteminə malik olmayan, radiasiyaya həssas (*RAD*) mutantların ayrılması və analizi bu prosesi öyrənməyə imkan yaratmışdır. Virtual olaraq maya göbələyinin bütün Rad zülallarının insan genomunda homoloqu var və insanın və maya göbələyinin bu zülalları tamamilə eyni qaydada fəaliyyət göstərirlər.



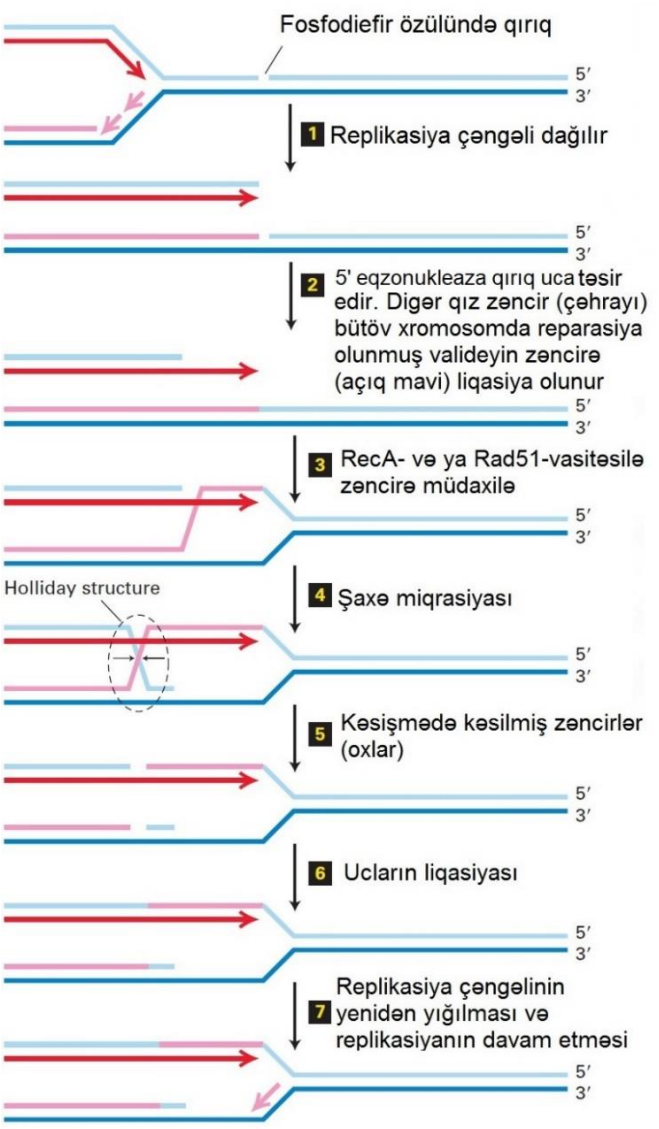
ƏKİL 5-39 Qeyri homoloji sonluqların birləşməsi. (a) İki-zəncirli qırıqların reparasiyası üçün bacı xromotidin istifadəsi mümkün olmayanda, nukleotid ardıcıllıqlar bir yerə gətirilir, amma bütöv DNT şəklində birləşmiş olmurlar. Bu DNT ucları adətən eyni xromosom lokuslarından olurlar və bir yerə birləşdirilərdə bir neçə əsas itirilir. Hərdən müxtəlif xromosomların ucları təsadüfən birləşirlər. İki zülalın, Ku və DNT-birləşdirən proteinkinazanın (DNA-PK) kompleksi ikizəncirli qırıqların uclarına birləşir (pillə 1). Sinaps əmələ gəldikdən sonra, ucluqlar nukleazalarla daha da təsir edilir, nəticədə iki əsas uzaqlaşdırılır (pillə 2) və iki ikiqat-zəncirli molekullar liqazalarla birləşdirilir (pillə 3). Nəticədə iki-zəncirli qırıq reparasiya olunur, amma, qırıq nahiyəsində olan bir neçə əsas cütü atılr. Bax G. Chu, 1997, *J. Biol. Chem.* **272**:24097; M. Lieber et al., 1997, *Curr. Opin. Genet. Devel.* **7**:99; və D. van Gant et al., 2001, *Nature Rev. Genet.* **2**:196. (b) İkiqat DNT uclarına birləşmiş KU70/KU80-ın quruluşu. Kompleks DNT-nin aksis oxu boyu aşağıdan görünüşü (*solda*) və yandan görünüşü (*sağda*) göstərilir. KU80 açıq yaşıl, KU70 tünd yaşıl, DNT mavidir. [(b) hissəsi J. R. Walker, R. A. Corpina, and J. Goldberg, 2001, *Nature* **412**:607, PDB ID 1jey.]

Yuxarıda müzakirə olunmuş mexanizmlərlə bərpa oluna bilməyən müxtəlif DNT zədələnmələri zədələnmiş ardıcıllığın diploid orqanizmlərdə homoloji xromosomda olan, eyni dərəcədə və ya daha yüksək homologiyaya malik olan zədələnməmiş DNT ardıcıllığından surətinin köçürülməsi ilə fəaliyyət göstərən mexanizmlərlə bərpa oluna bilər. Bu mexanizmlərə, ayrı-ayrı DNT molekulları arasında zəncirlərin mübadiləsi daxildir, ona görə də **DNT rekombinasiyası** adlanır.

DNT reparasiya mexanizminin təmin olunmasından başqa, oxşar rekombinasiya mexanizmləri, rüşeyim hüceyrələrini (sperma və yumurta) əmələ gətirən xüsusi hüceyrə bölünməsi meyoz zamanı ana və ata homoloji xromosom cütlərinin böyük rayonları arasında mübadiləyə səbəb olaraq növün fərdləri arasında genetic müxtəlifliyi yaradır (bax Şəkil 6-3). Əslində, homoloji xromosomlar arasında nahiyələrin ***krossinq-over*** adlanan mübadiləsi, hüceyrənin birinci meyoz bölünməsi zamanı xromosomların düzgün seqreqasiyası üçün tələb olunur. Meyoz və rekombinasiya yolu ilə bir xromosomda ana və ata genlərin yeni kombinasiyanın yaranmasının əhəmiyyəti Fəsil 6-da müzakirə olunur, meyoz zamanı xromosomların düzgün seqreqasiyasına aparan mexanizm isə Fəsil 20-də müzakirə olunur. Burada biz diqqətimizi DNT rekombinasiyasının molekulyar mexanizmlərinə cəmləyəcəyik və rekombinasiya edən DNT molekulları arasında DNT zəncirlərinin mübadləsini işıqlandıracağıq.

Dağılmış Replikasiya Çəngəlinin Bərpası Rekombinasiya yolu ilə DNT reparasiyasına nümunəsi "dağılmış" replikasiya çəngəlinin bərpasıdır. Əgər DNT zəncirinin birində fosfodiefir özüldəki qırılma replikasiya çəngəli keçib gedənə kimi bərpa olunmazsa, replikasiyanın helikazası valideyin DNT zəncirindəki kəsiyə çatanda "nick"in hər iki tərəfində ana zəncirin iki fraqmenti arasında kovalent rabitə olmadığlndan qız xromosomlarda replikasiya olunmuş hissələr ayrılır. Bu proses ***replikasiya çəngəlinin dağılması*** adlanır (Şəkil 5-40, pillə 1). Əgər iki-zəncirli qız DNT molekulunda qırılma bərpa olunmazsa, bu ümumiyyətlə xromosomdakı qırıqla onun sonluğu arasındakı genetik informasiyanın itməsi səbəbindən hüceyrə bölünməsindən sonra yeni əmələ gəlmiş qız hüceyrələrindən ən azı biri üçün öldürücü olmalıdır. Əmələ gəlmiş ikiqat-zəncirli qırıqları və replikasiya çəngəlini bərpa edən rekombinasiya prosesində çoxsaylı müxtəlif fermentlər və başqa zülallar iştirak edirlər, burada onlardan yalnız bir neçəsinin adı çəkilir.

İkiqat-zəncirli qırıqlarda reparasiyanın birinci mərhələsi DNT-nin qırılmış ucunda 5′ sonluqdan zəncirin eqzonukleolitik dağıdılması və zənciri qırığın 3′ sonluğunda tək-zəncirli vəziyyətdə saxlamaqdır (Şəkil 5-40, pillə 2). Bütöv valideyin zəncirlə (tünd göy) əsas-cütü əmələ gətirmiş yeni sintez olunan gecikən zəncir (çəhrayı) Şəkil 5-40, pillə 2-də göstərildiyi kimi, valideyin xromosomun replikasiya olunmamış (açıq göy) hissəsinə liqasiya olunur. Növbəti mərhələ üçün tələb olunan kritik zülal bakteriyalarda RecA və *S.cervisiae* və başqa eukariotlarda onun homoloqu Rad51-dir. Çoxsaylı RecA/Rad51 molekullar tək-zəncirli DNT-yə birləşirlər və başqa, homoloji ikiqat-zəncirli DNT molekulunda olan tam komplementar və ya tam komplementara yaxın ardıcıllığa hibridləşməni kataliz edirlər. Bu ikiqat-zəncirli hədəf DNT-nin komplementar zənciri (tünd göy) DNT-nin tək-zəncirli ilgəyi kimi müdaxilə olunan zəncirə hibridləşmənin getdiyi nahiyə boyunca dəyişdirilir (Şəkil 5-40, pillə 3). İki-zəncirli DNT-də zəncirlərdən birinin tək-zəncirli komplementarının RecA/Rad51 ilə kataliz olunan *müdaxiləsi* rekaombinasiya prosesinin açarıdır. Bu proses ***zəncirin müdaxiləsi*** **(strand invasion)** adlanır və əsas cütlərinin sayında dəyişiklik olmadığından (proses zamanı əsas-cütünün əlavə olunması və ya itirilməsi olmadığından), bu prosesin gedişi enerji daxil olmasını tələb etmir.



ŞƏKIL 5-40 Dağılmış replikasiya çəngəlinin rekombinasiya yolu ilə bərpası. Valideyin zəncirlər açıq və tünd göydür. Aparıcı qız zəncir tünd qırmızı, və gecikən qız zəncir çəhrayıdır. Pillə 3-dəki və ətrafındakı diaqonal xətlər rənglərə uyğun olan DNT zəncirlərində vahid fosfodiefir əlaqələrini göstərir. Pillə 4 arxasınca gələn kiçik qara oxlar Holidey quruluşunda DNT zəncirlərinin kəsişdiyi yerlərdə fosfodiefir əlaqələrin kəsildiyini göstərir. *E.coli* zülalları RuvA və RuvB ilə kataliz olunan sahə miqrasiyasının animasiyasına aşağıdakı saytda bax: http://www.sheffield.ac.uk/mbb/ruva. Müzakirə üçün tekstə bax.

Sonra, hədəf DNT ilə mudaxilə edən zəncir arasındakı hibrid rayon, ATP hidrolizinin enerjisindən isrifadə edən zülallar vasitəsi ilə qırılmış yerdən kənara doğru uzanır. Bu

proses ***şaxə miqrasiyası*** adlanır (Şəkil 5-40, pillə 4), çünki hədəf DNT zəncirinin bir komplementar zənciri (tünd göy) qırılmış DNT molekulunda (tünd qırmızı) ona komplementar olan zəncirə kəsib keçdiyi mövqe, daha doğrusu pillə 3-dən sonrakı çəhrayı diaqnal xəttd, DNT-nin quruluşunda ***şaxə*** adlanır. Bu diaqramda diaqnal xətlər yalnız bir fosfodiefir əlaqəsini göstərir. Molekulyar modelləşmə və digər tədqiqatlar göstərdi ki, şaxənin istənilən tərəfində birinci nukleotid komplementar nukleotidlə əsas cütü əmələ gətirmişdir. Bu şaxə sola miqrasiya edən kimi əsas cütlərinin sayı sabit qalır, müdaxilə edən zəncirlə formalaşan yeni bir əsas cütü (qırmızı) valideyin zəncirdə (mavi) itirilmiş əsas cütü ilə uyğun gəlir.

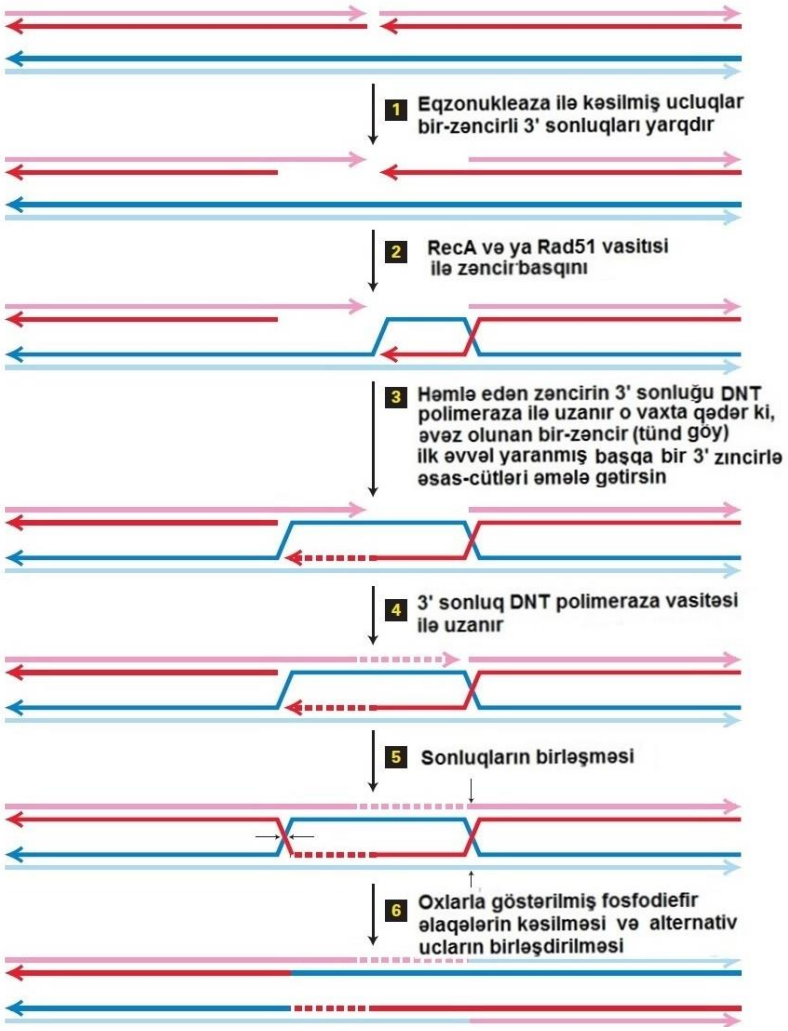
Hibrid rayon qırılmış zəncirin pillə 2-də 5′ endonukleaza ilə kəsilmiş 5′ sonluğundan (açıq mavi) kənara uzandıqda, bir-zəncirli valideyin DNT-nin zənciri (açıq mavi) şaxə sola miqrasiya etdikcə tək-zəncirli olan digər valideyin zəncirin (tünd göy) komplementar rayonu ilə əsas-cütü əmələ gətirir (Şəkil 5-40, pillə 4). Nəticədə alınmış quruluş, bunu genetik rekombinasiyada, aralıq mərhələ kimi adlandıran genetik Robin Hollideyin şərəfinə **Hollidey quruluşu (Holliday structure)** adlandırılır. Yenidən, diaqramda pillə 4-dən sonra davam edən diaqonal xətlər vahid fosfodiefir əlaqələrini təmsil edir və Holidey quruluşda olan bütün əsaslar valideyin zəncirdə olan komplementar əsaslarla əsas-cütü əmələ gətirirlər. Bir valideyin zəncirdən digərinə *kəsişən (cross over)* (pillə 5) fosfodiefir əlaqələrin qırılması və eyni valideyin zəncirlə əsas cütü əmələ gətirən 5′ və 3′ sonluqların liqasiyası (pillə 6) replikasiya çəngəlinə oxşar quruluşun yaranmasına gətirib çıxarır. Replikasiya çəngəli zülallarının yenidən birləşməsi aparıcı zəncirin orijinal zəncirdəki qırılma nöqtəsindən keçərək uzunamasına və gecikən zəncirin sintezinin yenidən inisiasiyasına (pillə 7) səbəb olur, beləliklə replikasiya çəngəli yenidən bərpa olunur. Ümumilikdə proses imkan verir ki, pillə 2-in ardınca gələn aşağıdakı molekulun liqasiya edən yuxarı zənciri pillə 7-də aparıcı zəncirin uzunaması üçün templeyt kimi istifadə edilsin.

Homoloji Rekombinasiya ilə İki-Zəncirli Qırığın Bərpası

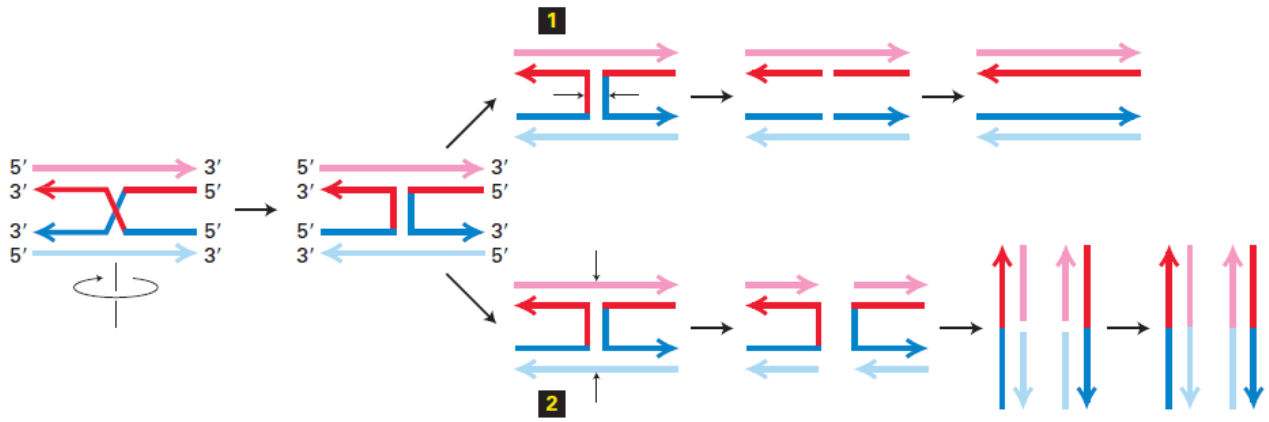
Homoloji Rekombinasiya adlanan oxşar mexanizm xromosomda iki-zəncirli qırıqları reparasiya və iki iki-zəncirli DNT molekulunun böyük seqmentlərini mübadilə edə bilir (Şəkil 5-41). Əvvəlcə, DNT molekulunun qırılmış sonluğu 5′-eqzonukleazalarla kəsilir və DNT-nin 3′ sonluqlarında bir-zəncirli nahiyələr əmələ gəlur (pillə 1). Sonra bakteriyalarda RecA və eukariotlarda Rad51, yuxarıda qeyd olunduğu kimi, dağılmış replikasiya çəngəlini bərpa etmək üçün (pillə 2) zəncirlərin 3′ sonluğundan birinin homoloji xromosomda olan homoloji rayona müdaxiləsini kataliz edir. Sonra, müdaxilə edən DNT zəncirinin 3′ sonluğu DNT polimeraza vasitəsi ilə uzadılır, DNT-nin uzunayan bir-zəncirli ilgəyi kimi valideyin zənciri əvəz edir (tünd göy) (pillə 3). İlgək uzunayaraq DNT-nin digər qırılmış ucuna komplementar olan ardıcıllığa çatanda (pillə 1-in ardınca sol tərəfdəki fraqment), komplementar ardıcıllıqlar əsas-cütü əmələ gətirirlər (pillə 3-ün ardınca gələn diaqram). Sonra bu 3′ sonluq, valideyin DNT-nin dəyişdirilmiş bir-zəncirli ilgəyini (tünd göy) templeyt kimi istifadə edərək DNT polimeraza vasitəsi ilə uzunayır (pillə 4).

Yeni yaranan 3′ sonluqlar (pillə 5), sonra eqzonukleaza ilə doğranmış 5′ sonluğa birləşdirilir. Bu, cütləşmiş molekullarda iki Holidey quruluşu yaranır (pillə 5). Holidey quruluşun şaxə miqrasiyası istənilən istqamətdə baş verə bilər (diaqramda göstərilməyib). Sonda, zəncirlərin oxlarla göstərilmiş səviyyətlərdə kəsilməsi və hər bir kəsilmiş Holidey quruluşda alternativ 5′ və 3′ sonluqların liqasiyası iki ***rekombinant xromosomu*** yaradır, bunlar da, ilkin qırılma nöqtəsinin bir tərəfində bir valideyin DNT molekulu (çəhrayı və qırmızı zəncirlər), qırılma nöqtəsinin digər tərəfində isə digər valideyin DNT molekulu (açıq və tünd göy rənglər) yerləşmiş DNT molekuluna malik olurlar (pillə 6). İlkin qırılma nöqtəsinin çox yaxın nahiyəsi ***heterodupleks*** yaradır, bunun da bir valideyin DNT-dən olan bir zənciri başqa valideyin DNT-dən olan komplementar zəncir ilə əsas-cütü əmələ gətirir (çəhrayı və ya qırmızı zəncirlər açıq və ya tünd göy zəncirlərlə əsas-cütü əmələ gətirirlər). İki valideyin zəncir arasında uyğun gəlməyən (mismach) əsas-cütləri adətən, yuxarıda müzakirə olunan reparasiya mexanizmi ilə bərpa olunaraq komplementar əsas cütlərini yaradırlar. Bu proses zamanı, iki valideyin arasında nukleotid ardıcıllığı fərqi itir, bu proses **gen konversiyası (gen çevrilməsi)** adlanır.

Şəkil 5-42, Holidey quruluşda dörd-tərəfli zəncir qovuşmasında zəncirlərin bu və ya digər cütünün kəsilməsinin valideyin və ya rekombinant molekulları necə yaratdığını göstərir. Holidey quruluşun ***rezolyusiyası*** adlandırılan bu proses, RecA/Rad51 ilə kataliz olunan zəncir basqını (invasion) yolu ilə ilkin olaraq qovuşmuş DNT molekullarını bir-birindən ayırır. Şəkil 5-41, pillə 5-n ardınca gələn aralıq mərhələdə hər bir Holidey quruluş, Şəkil 5-42-də iki kiçik qara oxlar dəsti (pillə 1 və ya pillə 2) ilə göstərilən iki mümkün yolla kəsilə və yenidən birləşdirilə bilir. Uyğun olaraq, Şəkil 5-41-də göstərilən rekombinasiya prosesinin dörd mümkün olan məhsulu yaranır. Doğranmış ucları liqasiya olunduqdan sonra, bu məhsullardan ikisi [bu və ya digər valideyinin ardıcıllığına reparasiya olunmuş qırılma nöqtəsindəki heterodupleks rayon istisna olmaqla (**gen konversiyası**)] valideyin xromosomları regenerasiya edir. Digər iki mümkün olan məhsul, Şəkil 5-41-də göstərildiyi kimi, rekombinant xromosomları yaradır.



ŞƏKİL 5-41 İkizəncirli DNT qırılması homoloji rekombinasiya ilə reparasiya olunur. Sadəlik üçün hər bir ikiqat-zəncirli DNT iki paralel xətlərlə təsvir olunmuşdur və zəncirlərin polyarlığı onların 3′ sonluğunda oxlarla göstərilmişdir. Yuxardakı molekulda ikiqat zəncirdə qırılma var. Qeyd etmək lazımdır ki, yuxarıdakı DNT molekulunun diaqramında 3′ sonluqlu zəncir sağ tərəfdə üstdə olduğu halda aşağıdakı DNT molekulunun diaqramında bu zəncira şağ tərəfdə altdadır. Müzakirə üçün tekstə bax. Bax T.L. Orr-Weaver and J.W.Szostak, 1985, *Microbiol. Rev.* 49:33.



ŞƏKİL 5-42 Holidey quruluşun alternativ rezolyusiyası. Diaqonal və vertikal xətlər bir fosfodiefir əlaqələrini göstərir. Sadəcə olaraq prosesi aşağıdakı molekulun diaqramını 180° elə fırlatmaqla çəkmək olar ki, yuxarıdakı və aşağıdakı molekullar eyni zəncir orientasiyasına malik olsunlar. Əlaqələrin 1-də göstərildiyi kimi kəsilməsi və sonluqların liqazalarla birləşdirilməsi, göstərildiyi kimi, orjinal xromosomları regenerasiya edir. Zəncirlərin 2-də göstərildiyi kimi kəsilməsi və yenidən aşağıda göstərildiyi kimi liqazalarla birlədirilməsi rekombinant xromosomu yaradır

5.6 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSIYALARI

DNT reparasiyası və rekombinasiyasıı

- DNT ardıcıllığındakı dəyişilmələr onun surətinin köçürülməsi zamanı baş verən səhvlər nəticəsində və müxtəlif fiziki və kimyəvi təsirlər nəticəsində yaranır.
- DNT replikasiyası prosesində baş verən bir sıra surətin köçürülməsi səhvləri DNT polimerazanın doğruluğun oxunması funksiyası ilə bərpa edilir, bu zaman DNT polimeraza uzunayan zəncirin 3′ sonluğunda səhv (düzgün cütləşməyən) əsası tanıyır və sonra onu daxili 3′→5′ eqzonukleaza fəallığı ilə uzaqlaşdırır (bax Şəkil 5-33).
- Eukariotik hüceyrələr, səhv cütləşmiş əsasları düzəltmək üçün və kimyəvi zədələri DNT-dən uzaqlaşdırmaq üçün üç eksizsion reparasiya sisteminə malikdirlər. Əsasın eksizsion reparasiya, uyğun olmayan kəsiklərin reparasiyası və nukleotid eksizsion reparasiyalar həddən yüksək dəqiqliklə fəaliyyət göstərir və ümumiyyətlə səhvləri buraxmır.
- İki-zəncirli qırıqların qeyri-homoloji ucların qovuşması yolu ilə reparasiyası müxtəlif xromosomlardan olan DNT seqmentlərini əlaqələndirə bilir və mümkündür ki, onkogen xromosom yerdəyişmələrini (translokasiyaları) yaradır. Hətta eyni xromosomdan olan seqmentlər birləşdikdə belə reparasiya mexanizmi kiçik silinmələri (delesiyalrı) da edir.
- DNT-də ikiqat-zəncirli qırıqların səhvsiz reparasiyası, zədələnməmiş bacı xromatidi templeyt kimi istifadə etməklə homoloji rekombinasiya yolu ilə həyata keçirilir.
- Kseroderma piqmentozum olan fərdlərdəki kimi, nukleotid eksizsion reparasiya yolunda, irsən keçmiş qüsurlar onları dəri xrşənginə meyilli edir. İrsən ötürülən yoğun bağırsağın xərçəngi çox hallarda, uyğun olmayan əsasların reparasiyası yolu üçün əhəmiyyətli olan zülalların mutant forması ilə bağlı olur. Homoloji rekombinasiya yolu ilə reparasiyada qüsurlar *BRCA-1* və ya *BRCA-2* genlərin bir mutant allelinin irsi olması ilə əlaqəlidir, bunun nəticəsində süd vəzisi və uşaqlıq xərçənginə meyillilik artır.

5.7 Viruslar: Hüceyrənin Genetik Sisteminin parazitləri

Viruslar hüceyrədaxili oblikat parazitlərdir. Onlar öz-özünü artıra bilmirlər, ona görə də virus zülallarını sintez etmək üçün və bəzi hallarda virus genomunu replikasiya etmək üçün sahib hüceyrənin sintez maşınını zəbt etməlidirlər. Adətən sahib hüceyrənin sitoplazmasında replikasiya edən RNT virusları RNT genomuna malik olurlar, adətən sahib hüceyrənin nüvəsndə replikasiya edən DNT virusları isə DNT genomuna malik olurlar (bax Şəkil 5-1). Virus genomları, onların spesifik tipindən asılı olaraq ikiqat-zəncirli və ya bir zəncirli olurlar. **Virion** adlanan bütöv yoluxdurucu virus zərrəcik nuklein turşusundan və onu əhatə edən zülallardan ibarət olan zirehdən təşkil olunub, zülallar nuklein turşularını mühafizə edir və və sahib orqanizmin yoluxmasında fəaliyyət göstərirlər. Ən sadə virus yalnız dörd zülalı kodlaşdıra bilən DNT və ya RNTyə malik olur, ən mürəkkəb virus isə ~200 yaxın zülalı kodlaşdıra bilir. Viruslar, onların xəstəliyin əmələ gəlməsinə səbəb olmaq kimi şübhəsiz xassələrindən başqa, bu fəsildə müzakirə olunan fundamental bioloji tədqiqatlar zamanı istifadə edilən tədqiqat vasitəsi kimi həddən artıq əhmiyyətlidirlər.

Əksər Virusların Sahib Orqanizm Sırası Məhduddur

Virionların səthi, bir tip zülalın çoxsaylı nüsxəsinə malikdir və bunlar sahib orqanizmdə olan reseptor zülalların çoxsaylı nüsxələrinə spesifik birləşirlər. Belə qarşılıqlı əlaqə *sahib orqanizm sırasını* - virusun yoluxdura biləcəyi hüceyrə tiplərini təyin edir və yoluxma prosesini başlayırlar. Virusların çoxu kifayət qədər məhdud sahib orqanizm sırasına malikdir.

Yalnız bakteriyanı yoluxduran virus **bakteriofaq** və ya sadəcə olaraq ***faq*** adlanır. Heyvan və ya bitki hüceyrələrini yoluxduran viruslara da heyvan virusları və ya bitki virusları deyilir. Çox az viruslar var ki, onlar həm heyvan həm də bitki orqanizmini və eləcə də onlarla qidalanan həşaratları yoluxdurub artırlar. Yüksək dərəcədə hərəkətli olan həşaratlar yoluxa bilən heyvan və ya bitki sahiblər arasında virusların keçirici vektoru rolunu oynayırlar. Geniş sahib orqanizm sırasına malik olmaq çox az heyvan viruslarına aiddir, məsələn vazikulyar stomatit virusu, həşarat vektorlarda və çoxsaylı müxtəlif tipli məməlilərdə artır. Heyvan viruslarının çoxu sahib orqanizm üçün tip (phylum) səviyyəsindən kənara çıxmırlar və bəziləri (məsələn, poliovirus) çox yaxın olan növləri, məsələn primatları, yoluxdururlar. Bəzi heyvan virusları üçün sahib-hüceyrə sırası məhdud sayda olur, çünki yalnız bu hüceyrələr virusların yapışa (tuta) biləcəyi, uyğun olan səth reseptorlarına malikdirlər. Buna bir misal polioviruslardır, bunlar yalnız bağırsaq hüceyrələrini yoluxdururlar və təəssüf ki, onurğa beyinin motor neyronlarını da yoluxdura bilirlər və onlarda iflic əmələ gəlməsinə səbəb olurlar. Başqa bir virus, aşağıda, sonra müzakirə olunacaq HIV-1, $CD4^+$ T-limfositlər adlandırılan və immun sistemi üçün əhəmiyyət kəsb edən hüceyrələri yoluxdurur və QİÇS (AIDS) törədir (bax Fəsil 23), həmçinin bəzi neyron hüceyrələrini və mərkəzi sinir sisteminin qlial hüceyrələr adlanan başqa hüceyrələrini də yoluxdururlar.

Virus Kapsidləri Bir və ya Bir Neçə Tip Zülallar Sırasından İbarətdir

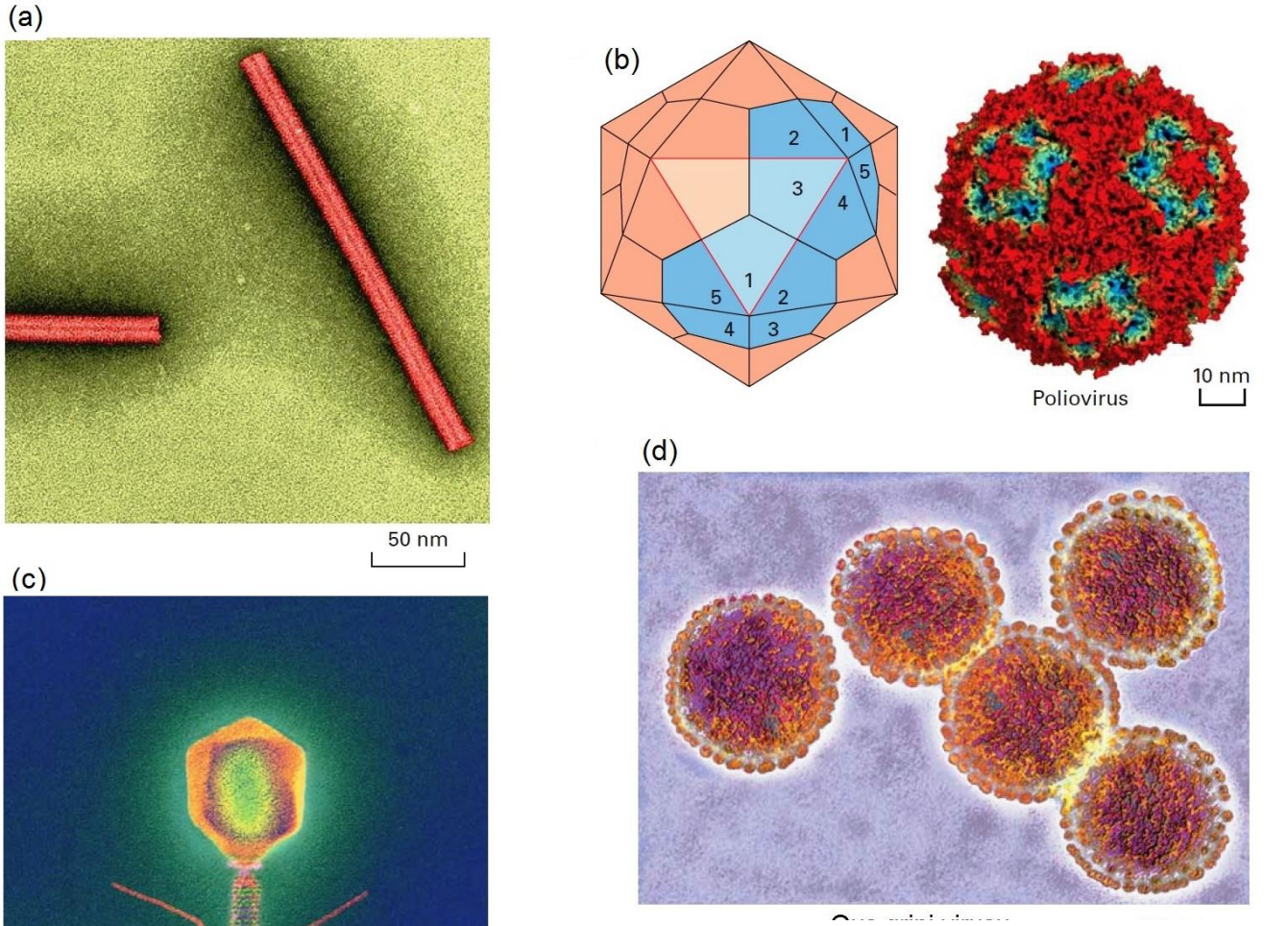
Virusun nuklein turşusu, eyni zülalın çoxsaylı nüsxələrindən və ya hər biri ayrıca virus geni ilə kodlaşdırılan bir neçə fərqli zülallardan təşkil olunmuş zülal qabıq və ya **kapsid** altında örtülmüşdür. Bu quruluşuna görə, virus az sayda olan genlərdə müqayisəli dərəcədə çox böyük kapsidi düzəltmək üçün lazım olan bütün informasiyanı kodlaşdıra bilir. Məhdud miqdarda DNT və ya RNT-yə malik olduğundan və ona görə də məhdud sayda genlər virus kapsidinə uyğun gəldiyindən genetik informasiyanın belə səmərəli istifadə olunması çox əhəmiyyətlidir. Kapsid və onun örtdüyü nuklein turşusu birlikdə **nukleokapsid** adlanır.

Təbiət çoxsaylı kapsid zülal subvahidlərinin düzülməsində və virus genomunun virionda yerləşdirilməsində iki başlıca yol seçmişdir. Bəzi viruslarda vahid örtük zülalının çoxsayli nüsxələri ***spiral*** quruluş yaradır, bu zülal trubka daxilində spiral şırımdan keçən virus DNT-sini və ya RNT-sini örtərək mühafizə edir. Bu cürə spiral quruluşa malik olan viruslar, məsələn tütünün mozaik virusu çubuğa bənzər forma alır (Şəkil 5-43a). Başqa əsas quruluş tipi ***ikosahedron***a bənzər formadır, bərk, təxminən kürə şəkilli əşya olub, 20 eyni (identik) səthdən təşkil

olunub, və hər səth bərabər tərəfli üçbucaqdan ibarətdir (Şəkil 5-43b). Yoluxma zamanı, bəzi ikosahedral viruslar kapsid subvahidlər arasında olan yarıqlar (çatlar) vasitəsilə sahib hüceyrənin səth reseptorları ilə qarşılıqlı əlaqəyə girirlər. Başqaları ikosafedrondan uzanıb çıxan lifə bənzər zülal çıxıntıları ilə (genişlənmələrlə) qarşılıqlı əlaqə yaradırlar.

Çox DNT bakteriofaqlarında, virus DNT-si çöpə-bənzər "quyruğ"a yapışmış ikosahedral "baş"da yerləşir. Yoluxma zamanı, virus zülalı quyruğun ucuyla sahib-hüceyrənin reseptoruna birləşir, sonra virus DNT-sı bütün quyruq nahiyəsindən keçərək sahib-hüceyrənin sitoplazmasına daxil olur (Şəkil 5-43c).

Bəzi viruslarda, simmetrik düzülmüş nukleokapsid xarici membranla və ya əsasən iki fosfolipid qatlarından təşkil olunmuş və tərkibində bir və ya iki tip virusla kodlaşdırılan qliko-zülallar olan nazik **qabıqla** ilə ötyülmüşdür (Şəkil 5-43d). Virusun örtük qabığında olan fosfolipidlər yoluxmuş sahib-hüceyrənin plazma membranında olan fosfolipidlərə bənzəyir. Əslində, virusun qabığı tumurcuqlama yolu ilə sahib hüceyrənin plazma membranından törənmişdir, amma tərkibində əsasən virus mənşəli qlikozüllara malikdir, biz bunu tezliklə müzakirə edəcəyik.



ŞƏKİL 5-43 Virionun quruluşu. (a) Tütünün spiralvari mozaik virusu. (b, *solda*) Kiçik ikosahedral virus. 20 bərabər tərəfli üçbucaqlı səthdən təşkil olunub, bunlardan biri qırmızı rənglə işarələnmişdir. Hər bir səth kapsomerlər adlanan üç işarələnmiş quruluş elementindən təşkil olunub. Rəqəmlər ikohaderonun zirvəsində beş kapsomerin necə assosasiya etdiyini göstərir. (b, *sağda*) Poliovirusun retgen-kristalloqrafiyasına əsaslanan fəza-dolduran modeli. Model virionun mərkəzindən olan məsafəyə əsaslanan rənglərlə kodlaşdırılmışdır, ən uzaqda olanlar qırmızı daha yaxın olanlar mavidir. Virus hər biri zirvə ətrafında mavi "kanyona" daxil olan uzun dar hüceyrə-səth zülalları olan sahib hüceyrə reseptoruna birləşir (*göstərilmir*). (c) Bakteriofaq T4. (d) Qrip virusu, qabıqlı viruslara aid bir nümunədir. [(a) hissəsi: Omikron/ Science Source. (b) hissəsi D. J. Filman et al., 1989. *EMBO J.*8:1567, PDB ID 2plv. (c) hissəsi Department of Microbiology, Biozentrum, University of Basel/Science Source. (d) hissəsi James Cavallini/ Science Source.]

Viruslar Klonlaşdırıla və Lövhə (Plaque) Sınaqlarında Sayıla Bilər.

Yoluxdurucu virus zərrəciklərin nümunədə miqdarı **lövhə sınaq yolu** ilə sayıla bilər. Bu eksperiment, duruldulmuş virus zərrəciklərinin sahib hüceyrələrlə örtülmüş qablarda kulturası yolu ilə həyata keçirilir və sonra əmələ gəlmiş ***lövhə*** (***plaque***) adlandırılan lokal zədələnmələr sayılır (Şəkil 5-44). Lövhə (Plaque) qablarda inkişaf edir, hardasa bir virus ilkin olaraq bir hüceyrəni yoluxdurur. Virus ilk sahib hüceyrədə replikasiya edir, sonra onu lizis edərək yeni nəsil virusları mühitə buraxır onlar qabda qonşu hüceyrələri yoluxdururlar. Yoluxmanın bir neçə belə tsiklindən sonra kifayət qədər belə yoluxmuş hüceyrələr lizis olunaraq yoluxmayan hüceyrələr qatında görünə bilən təmiz zonanı və ya lövhəni əmələ gətirirlər. Lövhədəki bütün yeni nəsil viruslar tək bir valideyin virusdan törədiyindən onlar virus klonunu əməl gətirirlər.

Bu cürə lövhə sınağı bakterial və heyvan virusları üçün istifadə olunan standart metoddur. Bitki virusları oxşar yolla, virusla inakulyasiya olunmuş (yoluxdurulmuş) bitki yarpağında lokal zədələnmələri saymaqla yoxlanıla bilər. Lövhə-sınaq yolu ilə ayrılmış virus mutantların analizi bu gün bizim molekulyar hüceyrə biologiyası sahəsində biliklərimizin genişlənməsinə kömək etmişdir.

Litik Virus Artma Tsiklləri Sahib-Hüceyrələrin Ölümünə Səbəb Olur

Baxmayaraq ki, müxtəlif tip virusların detalları arasında fərqlilər var, amma onlardan *litik dovrü* (*tsikli*) nümayiş etdirənlərin hamısı aşağıdakı mərhələləri keçirlər:

1. ***Adsorbsiya*** - Virion sahib hüceyrə ilə onun səthində olan xüsusi reseptorlara çox-nüsxəli kapsud zülallarının birləşməsi yolu ilə qarşılıqlı əlaqə yaradırlar.

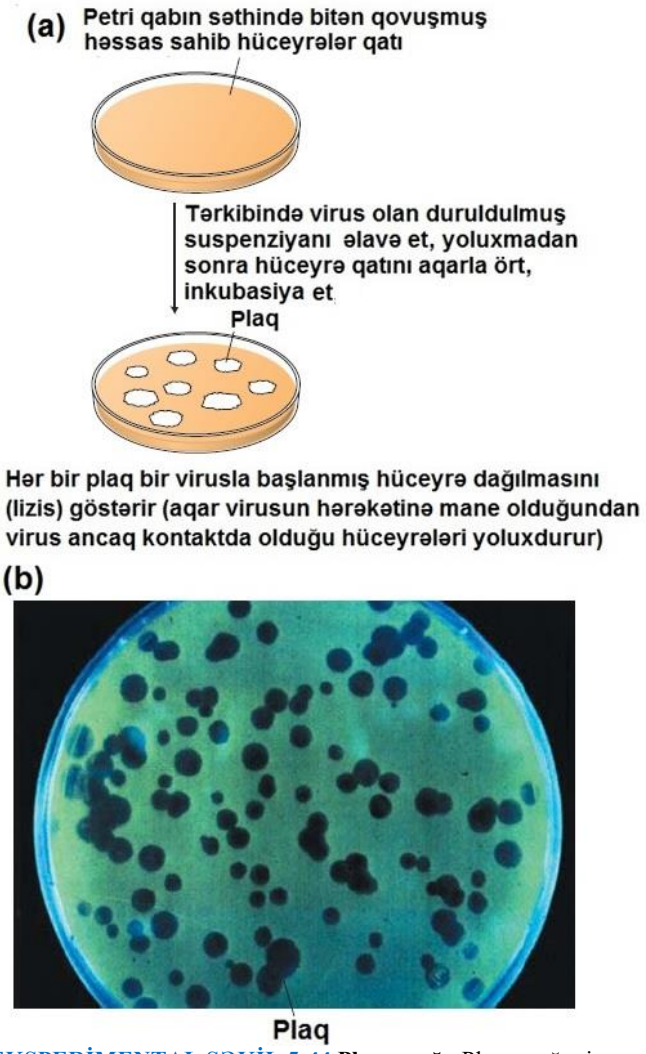
2. ***Penetrasiya*** (***daxil olmaq***) - Virus genomu plazma membranından daxilə keçir. Bəzi viruslarda kapsud daxilində olan virus zülalları da sahib hüceyrəyə keçirlər.

3. ***Replikasiya*** - Virus mRNT-ləri sahib hüceyrənin transkripsiya maşınının köməyi ilə istehsal olunur (DNT viruslar üçün) və ya virus fermentləri vasitəsi ilə istehsal olunur (RNT viruslar üçün). Hər iki tip viru üçün mRNT sahib-hüceyrənin translyasiya maşınının köməyi ilə translyasiya olunur. Çox-nüsxəli virus genomunun istehsalı ya yalnız virus zülallarının hesabına ya da sahib-hüceyrənin zülallarının köməyi ilə həyata keçirilir.

4. ***Toplanması*** (***Assembly)*** - Virus zülalları və replikasiya olunmuş genomu assosasiya edərək yeni nəsil virionları yaradırlar.

5. ***Buraxılması*** (***Release)*** - Yoluxmuş hüceyrələr ya qəflətən dağılır (lizis) və yeni formalaşmış virionların hamısını eyni zamanda buraxır, ya da tədricən parçalanaraq virionları da tədricən buraxır mühitə. Hər iki tip buraxılma sahib hüceyrənin ölümünə səbəb olur.

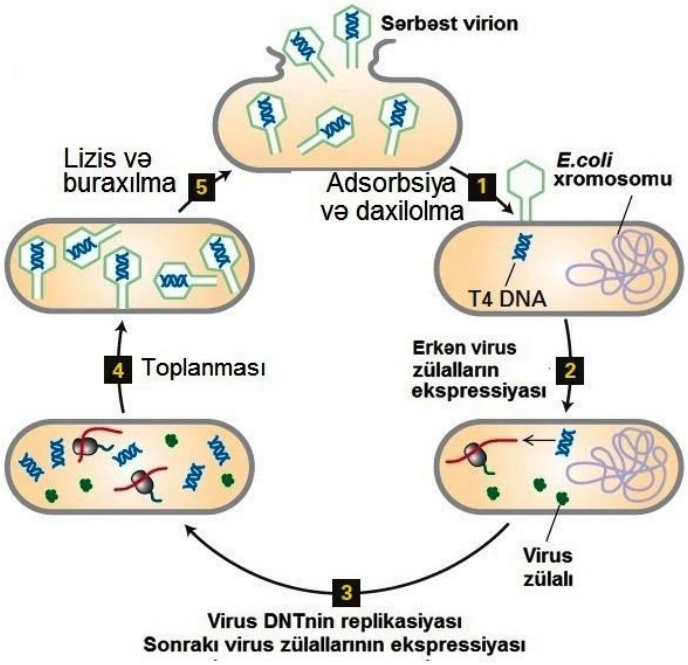
Şəkil 5-45, *E.coli*-ni yoluxduran, örtüksüz DNT virus - T4 bakteriafaqın litik dövrünü (tsiklini) təsvir edir. Ümumiyyətlə, virusun kapsid zülalları böyük miqdarda istehsal olunurlar, çünki onların çox nüsxəsi hər bir yeni nəsil virionun toplanması üçün tələb olunur. Hər bir yoluxmuş hüceyrədə, təxminən 100-200 T4 yeni nəsil virus yetişir və lizis yolu ilə mühitə buraxılır.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 5-44 Plaq sınağı. Plaq sınağı virus suspenziyasında yoluxmuş zərrəciklərin sayını təyin etməyə imkan verir. (a) Hər bir dağılma və ya plaq, bir virionun tək bir hüceyrəni yoluxdurduğu yerdə inkişaf edir. Hər bir plaq təmiz virus klonunu təşkil edir. (b) Bakteriofaq ΦS1 ilə yaşıl *Pseudomonas fluorescens* bakterialar üzərində alınmış plaq. [(b) hissəsi P. Rossi, 1994, Advances in biological tracer techniques for hydrology and hydrogeology using bacteriophages, Ph. D. thesis, University of Neuchatel, 200 pp. http://doc.rero.ch/record/2576/files/these_RossiP.]

Litik dövr, eukariot hüceyrələrini yoluxduran DNT viruslar üçün daha mürəkkəbdir. Belə virusların çoxunda DNT genom (birləşdiyi bir sıra zülallarla) hüceyrə nüvəsinə keçir. Hüceyrə nüvəsinə keçdikdən sonra virus DNT-si sahib-hüceyrənin transkripsiya maşınından istifadə edərək RNT-yə transkripsiya olunur. Virus RNT-nin ilkin transkriptinin sahib-hüceyrənin fermentləri ilə prosessinqi onu virus mRNT-yə çevirir və sonra sitoplazmaya daşınaraq sahib-hüceyrənin ribosomlarından, tRNT-dən və translyasiya faktorlarından istifadə olunaraq virus zülallarına translyasiya olunur. Virus zülalları sonra geriyə - nüvəyə daşınır, burada onlardan bəziləri ya birbaşa virus DNT-

ni replikasiya edir ya da əvvəlki bölmələrdə müzakirə olunan SV40-da olduğu kimi, sahib-hüceyrənin zülallarını virus DNT-nin replikasiyasına yönəldir. Kapsid zülalların yeni replikasiya olunmuş virus DNT-si ilə toplanması nüvədə baş verir və yüzdən minə qədər yeni nəsil viruslar əmələ gəlir. Məməlilərin hüceyrələri bakteriya hüceyrələrindən min dəfə böyük olduğundan hər hüceyrəyə görə min dəfə də artıq yeni virus istehsal olunur. Amma, bu qədər böyük miqdarda virusların toplanması üçün daha çox zülal sintez etmək və daha çox virus genomunu relikasiya etmək lazım olduğundan məməli hüceyrəsinin virusla yoluxması bakteriofaqla müqayisədə daha uzun zaman tələb edir. Bakteriofaq T4 *E. coli* hüceyrələrində təxminən 20 dəqiqqə müddətində replikasiya edib onu dağıdırlar (lyses), halbuki poliovirusun sahib hüceyrədə replikasiya edib onu dağıtması təxminən 8 saat tələb edir. Çox heyvan virusları poliovirusladan aşağı sürətlidirlər, yoluxmuş hüceyrənin dağılması və yeni nəsil virusların azad olaması təxminən iki gün çəkir.



ŞƏKİL 5-45 Qabıqsız bakterial virusun litik replikasiya dövrü. *E.coli*-nin T4 bakteriofaqı ikizəncirli DNT genomuna malik olub membran qabığı yoxdur. T4 virusun quyruğunun ucundakı örtük zülalları sahib hüceyrənin xarici örtüyündə xüsusi reseptor zülalları ilə qarşılıqlı əlaqə yaratdıqdan sonra virus genomu sahib hüceyrənin içərisinə keçirilir (pillə 1). Sonra, sahib-hüceyrənin fermenti virusun "erkən" genlərini mRNT-yə transkripsiya edir və uyğun olaraq onları virusun "erkən" zülallarına translyasiya edir (pillə 2). Erkən virus zülalları virus genomunu replikasiya edir və "sonrakı" virus genlərinin sahib hüceyrənin ferment sistemi ilə ekspressiyasını induksiya edir (pillə 3). "Sonrakı" virus zülallarına, kapsid və yığılma zülalları və daha çox virus DNT-si sintez etmək üçün lazım olan nukleotidlərin təmin olunması üçün sahib-hüceyrənin DNT-sini dağıdan fermentlər daxildirlər. Yeni nəsil vrionlar hüceyrə daxilində toplanır (pillə 4) və sonra virus zülalı sahib hüceyrəni dağıtdıqdan sonra hüceyrədən azad olurlar (pillə 5). Azad olmuş yeni viruslar yeni sahib-hüceyrələr üzərindi yeni yoluxma tsiklini başlayırlar.

RNT genomlu bitki və heyvan viruslarının çoxunun litik replikasiyası üçün nüvə funksiyası tələb olunmur. Bu virusların bəzilərində, virusla kodlaşdırılan fermentlər yoluxma zamanı sahib orqanizmə keçərək hüceyrə sitoplazmasında virusun genom RNT-sini mRNTyə trankripsiya edir. mRNT sahib orqanizmin translyasiya maşını vasitəsi ilə birbaşa virus zülalına translyasiya olunur. Bu zülallardan bir neçəsi sonra virus RNT genomunun əlavə nüsxələrini yaradır. Sonda, yeni nəsil genomlar yeni sintez olunmuş kapsid zülallarla toplanaraq sahib hüceyrənin sitoplazmasında yeni nəsil virusları yaradırlar.

Virusun və sahib hüceyrənin tipindən asılı olaraq bir neçə yüzdən yüz minlərə qədər yeni virionun sintezi başa çatdıqdan sonra, yoluxmuş bakterial hüceyrələrin çoxu və bəzi yoluxmuş bitki və heyvan hüceyrələri lizis olunaraq virionları bir dəfəyə buraxırlar. Amma, yoluxmuş bitki və heyvan hüceyrələrinin çoxunda diskret lizis baş vermir, əksinə ölmüş hüceyrə tədricən parçalanır və virionlar da tədricən azad olurlar.

Yuxarıda qeyd olunduğu kimi, örtüklü heyvan virusları, sahib orqanizmin plazma membranından törənmiş ikiqat lipid qatı ilə örtülüdür və tərkibində zəngin virus qlikozülallarına malikdirlər. Örtüklü virusların adsorbsiyası və buraxılması prosesi köklü şəkildə bu proseslərin örtüksüz viruslardakı gedişindən fərqlənir. Örtüklü viruslarda litik replikasiyanı təsvir etmək üçün quduzluq virusuna baxaq, onun nukleokapsidi bir zəncirli RNT genomundan və onu əhatə edən çoxnüsxəli nukleokapsid zülallardan təşkil olunmuşdur. Başqa litik RNT viruslar kimi, quduzluq virusu da sitopazmada replikasiya edir və sahib hüceyrənin nüvə fermentlərinin iştirakı tələb olunmur. Şəkil 5-46-də göstərildiyi kimi, quduzluq virusu endositoz yolu ilə adsorbsiya olunur (bax Fəsil 14, Şəkil 14-1 və 14-2), və yeni nəsil virionların buraxılması Şəkil 5-47-də göstərildiyi kimi, sahib hüceyrənin plazma membranından *tumurcuqlama* yolu ilə baş verir. Bir neçə on min yeni nəsil virionlar sahib hüceyrə hələ ölməmişdən öncə onun plazma membranından tumurcuqlama yolu ilə ayrılır.

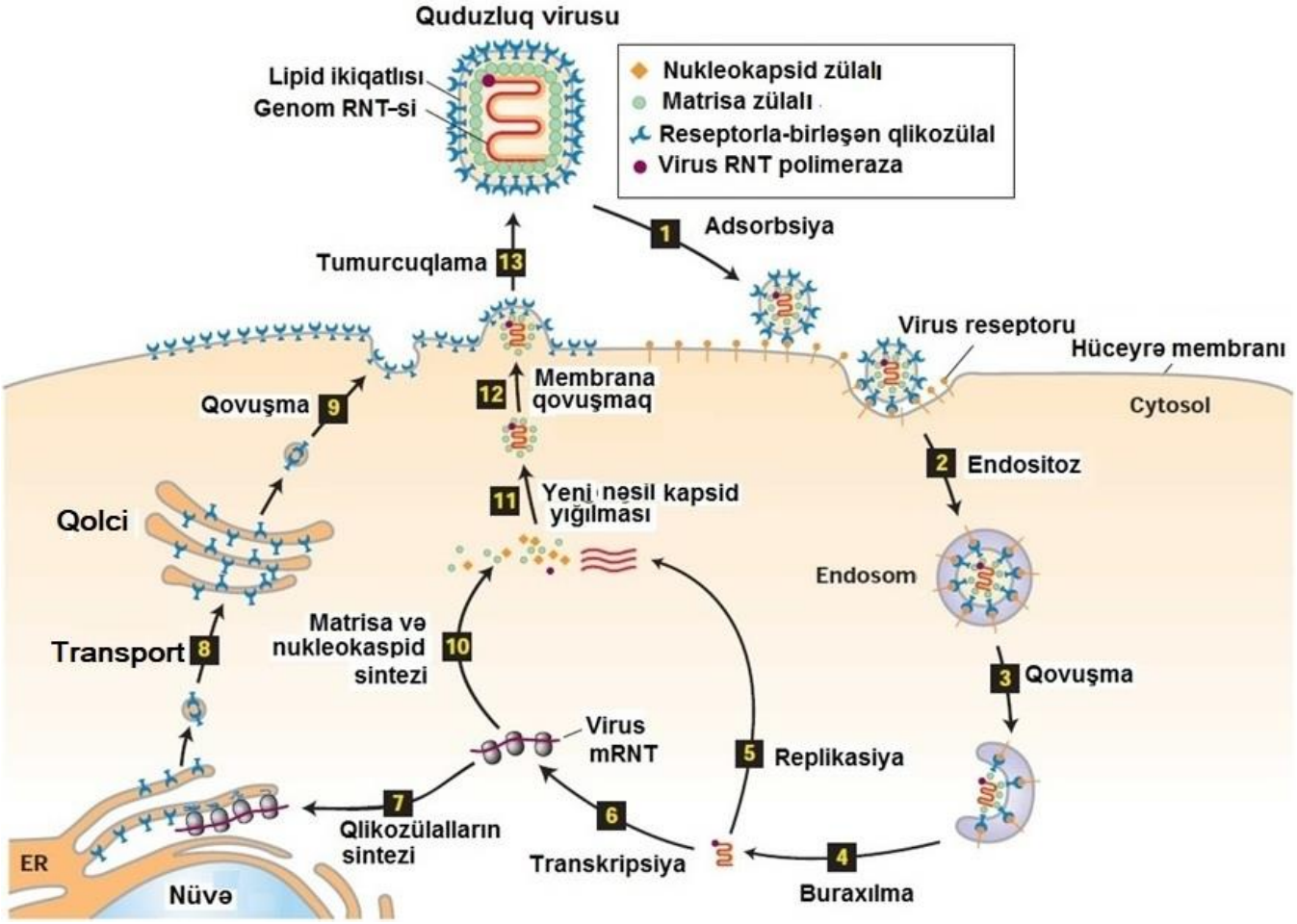
Qeyri Litik Virus Artma Dövrəsində Virus DNT Sahib Hüceyrələrinin Genomuna İnteqrasiya Edir

Mülayim (mötədil) faqlar adlandırılan bəzi bakterial viruslar öz sahib hüceyrələri ilə hüceyrəni öldürməyən qeyri litik assosasiya yaradırlar. Məsələn, λ-bakteriofaq *E.coli*-ni yoluxduranda, əksər hallarda litik yoluxmaya səbəb olur. Amma, hərdən virus DNT replikasiya etməkdənsə sahib hüceyrənin xromosomuna inteqrasiya edir. ***Profaq*** adlanan inteqrasiya etmiş virus DNT-si sahib hüceyrənin DNT-sinin bir hissəsi kimi bir hüceyrə nəsilindən digərinə replikasiya edir. Bu hadisə **lizogeniya** adalanır. Əgər sahib-hüceyrə onun DNT-sinə ultrabənövşəyi şüaların təsiri ilə geniş zədələnməyə məruz qalsa, o zaman profaq DNT fəallaşır özünü sahib orqanizmin xromosomundan kəsib ayırır və litik dövürə keçir sahib hüceyrə ölməmişdən yeni nəsil virionları artıb hüceyrədən buraxılır.

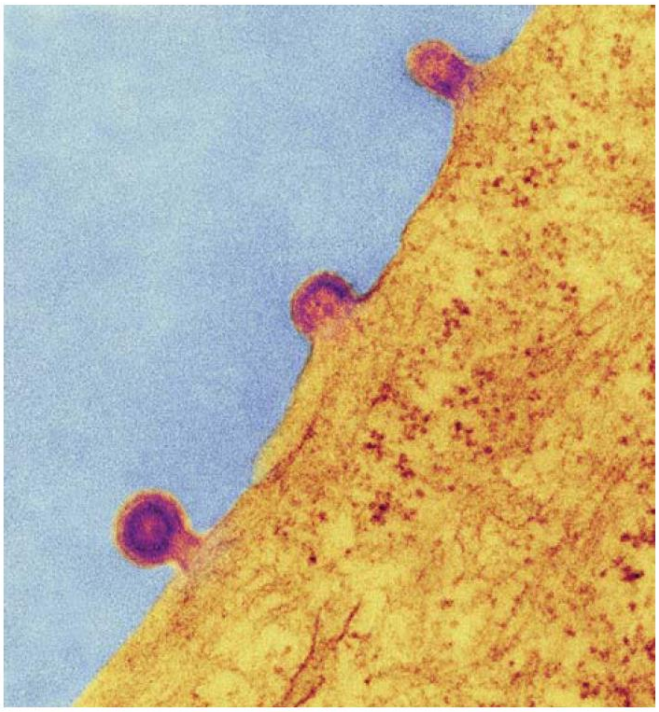
Çox heyvan viruslarının genomları da sahib-hüceyrənin genomuna inteqrasiya edə bilir. Bunların ən mühimləri arasında **retrovirusları** göstərmək olar, bunlar örtüklü viruslar olub genomları iki eyni RNT zəncirindən təşkil olunmuşdur. Bu viruslar ümumilikdə *retroviruslar* kimi məlumdurlar, çünki onların RNT genomu templeyt kimi DNT molekulunun sintezində – genetik məlumatın daha ümumi olan prosesdən, DNT-dən RNT-nin transkripsiyasına əks istiqamətdə axmasında istifadə olunur. Retrovirusun həyat tsiklində (Şəkil 5-48), **geriyə transkriptaza** adlanan virus fermenti virusun genom RNT-sini

ona komplementar olan bir zəncirli DNT-yə köçürür; eyni ferment sonra yeni bir-zəncirli DNT-yə komplementar olan ikinci DNT cəncirini sintez edir. (Bu reaksiya kompleksinin ətraflı izahı Fəsil 6-da buna yaxın olan prosesin, retrotranspozonlar adlandırılan hüceyrə-daxili parazitlərin müzakirəsində verilmişdir). Əmələ gəlmiş iki-zəncirli DNT virusdakı inteqraza fermenti vasitəsilə yoluxmuş hüceyrənin xromosomal DNT-nə inteqrasiya edir. Nəhayət, ***provirus*** adlanan inteqrasiya etmiş DNT, sahib-hüceyrənin transkripsiya maşını vasitəsi ilə RNT-yə transkripsiya olunur və sonra, ya virus zülallarına translyasiya olunur ya da virus örtük zülalları ilə örtülərək yeni nəsil virionları yaradır, sonuncular isə sahib-hüceyrənin plazma membranından tumurcuqlama yolu ilə azad olurlar. Retrovirusların çoxu öz sahib-hüceyrəsini öldürmədiyindən yoluxmuş hüceyrələr replikasiya edərək proviruslu DNT-si olan qız hüceyrələri əmələ gətirirlər. Bu qız hüceyrələr provirus DNT-nin transkripsiyasını davam etdirərək yeni nəsil virusları tumurcuqlayırlar.

Bəzi retroviruslar xərçəng-əmələ gətirən genlərə (*onkogenlərə*) malik olurlar, və belə retroviruslara yoluxmuş hüceyrələr onkogen olaraq şiş hüceyrələrinə çevrilirlər. Onkogen retrovirusların tədqiqatı (əsasən quş və siçan virusları) normal hüceyrələrin xərçəng hüceyrələrinə transformasiyası prosesinin gedişi üzrə çox şeyi üzə çıxarmışdır (bax Fəsil 24).

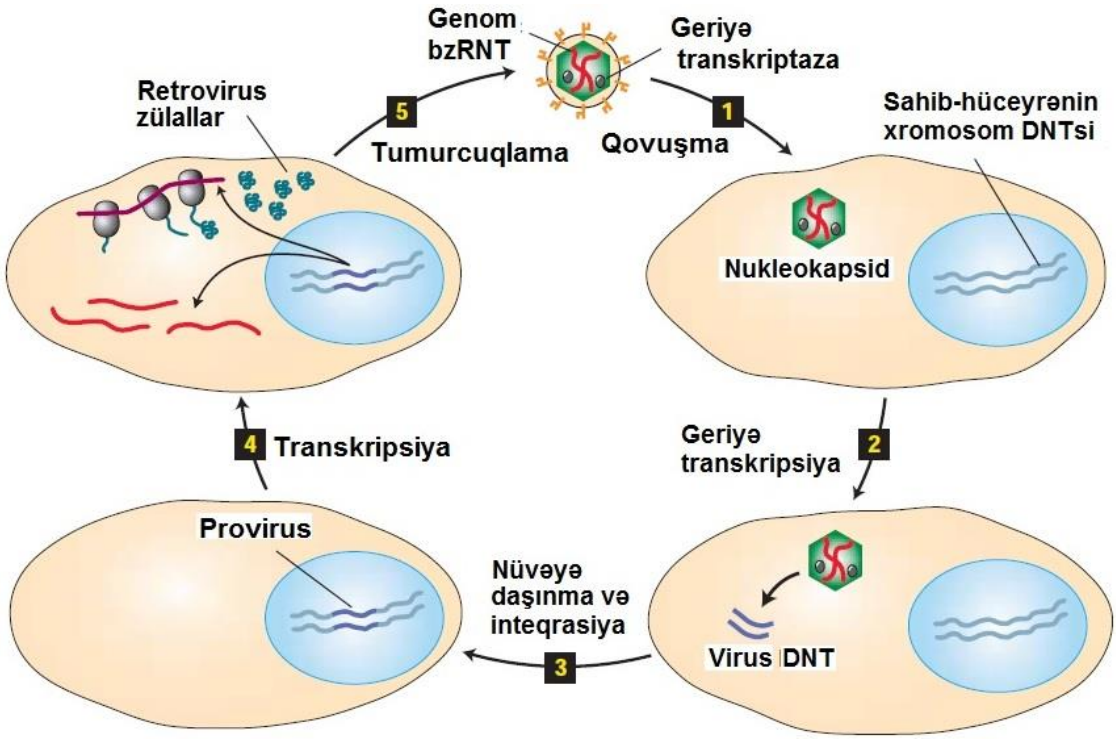


ŞƏKİL 5-46. Qabıqlı heyvan viruslarının litik replikasiya dövrü. Quduzluq virusu qabıqlı virus olub bir-zəncirli RNT genomuna malikdir. Bu virusların quruluş komponentləri yuxarıda verilmişdir. Virionlar sahib-hüceyrənin çoxsaylı spesifik zülallarına adsorbsiya olunduqdan sonra (pillə 1) hüceyrə onları endosomlara keçirir (pillə 2). Endosom membranlarında olan hüceyrə zülalları H^+ ionlarını sitozoldan endosomların daxilinə vurur. H^+ ionlarının miqdarının artması ilə endosomlar daxilində pH-ın aşağı enməsi nəticəsində virus qlikozülallarında konformasiya dəyişikliyi baş verir, bu da virus qabığının endosomun ikiqat lipid membranı ilə qovuşmasına və nəticədə nukleokapsidlərin sitoplazmaya buraxılmasına səbəb olur (illə 3 və 4). Virusun RNT polimerazası sitozolda ribonukleozid trifosfatları istifadə edərək virusun RNT genomunu replikasiya edir (pillə 5) və virusun mRNT-lərini sintez edir (pillə 6). Virus mRNT-lərindən biri virusun transmembran qlikozülallarını kodlaşdırır, və o endoplazmatik şəbəkəyə (ER) birləşmiş ribosomda translyasiya olunanda alınan zülal ER membranına girir (pillə 7). ER lümenlərində bu zülalın bükülmüş böyük domeninə karbohidratlar əlavə olunaraq (qlikozilləşmə) modifikasiya olunur, alınan qlikozülal Qolci aparatından keçir (pillə 8). Əmələ gələn yetişmiş qlikozülallı qovucuqlar sabib-hüceyrənin plazma membranı ilə qovuşur və virusun qlikozülalının böyük reseptor-birləşdirən domen hüceyrənin xarici tərəfində olmaqla hüceyrə səthinə yerləşdirir (pillə 9). Eyni zamanda başqa virus mRNT-lər sahib-hüceyrənin ribosomlarında nukleokapsid zülallarına, matrisa zülallarına və virusun RNT polimerazasına translyasiya olunurlar (pillə 10). Bu zülallar replikasiya olunmuş virus RNT genomu ilə toplanırlar (parlaq qırmızı) yeni nəsil nukleokapsidləri yaradırlar (pillə 11), bunlar da hüceyrənin plazma membranında olan virus transmembran qlikozülalın sitozol domeni ilə birləşir (ona bağlanır) (pillə 12). Plazma membran nukleokapsid ətrafında bükülərək onu əhatə edir və tumurcuq əmələ gətirərək tədricən xaricə buraxılır (pillə 13).



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 5-47. Yeni nəsil virusların tumurcuqlarla buraxılması. Qabıqlı virusların yeni nəsil virionları yoluxmuş hüceyrələrdən tumurcuqlama yolu ilə buraxılırlar. Misles virusu ilə yoluxmuş hüceyrənin transmissiyalı elektron mikroskopunda çəkilmiş bu şəkilində virion tumurcuqları hüceyrə səthində qabarmış çıxıntılar şəkilində aydın görünür. Misles virus, quduzluq virusu kimi spiral şəkilində nukleokapsidə malik olan qabıqlı RNT virusdur və Şəkil 5-46-da olduğu kimi replikasiya edir. [Thomas Deerinck, NCMIR/Science Source.]

Məlum olan insan retrovirusları arasında insanın T-hüceyrələrinin limfotrofik virusu (HTLV) leykomiyanın əmələ gəlməsinə səbəb olur, insanın immunçatışmazlığı virusu (HIV-1) qazanılmış immun çatışmazlığı sindromu (QİÇS - AIDS) xəstəliyini yaradır. Bu virusların hər ikisi yalnız xüsusi hüceyrə tipini, əsasən müəyyən immun sistemi hüceyrələrini yoluxdura bilir, HIV-1 olanda, bəzi mərkəzi sinir sistemi neyronlarını və qlial hüceyrələri də yoluxdurur. Yalnız bu hüceyrələr, virusun örtük qabıq zülalları ilə qarşılıqlı əlaqə yarada bilən hüceyrə-səthi reseptorlarına malikdirlər. Başqa retrovirusların çoxundan fərqli olaraq HIV-1 tədricən sonda sahib-hüceyrələri öldürür. Tədricən böyük miqdarda immun sistemi hüceyrələrinin ölməsi QİÇS üçün xarakterik olan qüsurlu immun cavabı ilə nəticələnir.



ŞƏKİL 5-48 Retrovirusların həyat dövrü. Retroviruslar bir-zəncirli RNT molekulunun iki eyni nüsxəsindən ibarət olan genoma malikdirlər və xaricdən qabıqla örtülü olurlar. Pillə 1: Virusun qabığında olan qlikozülal sahib hüceyrənin plazma membranında olan xüsusi reseptor zülallarla qarşılıqlı əlaqəyə girdikdən sonra retrovirusun qabığı sahib-hüceyrənin plazma membranı ilə qovuşaraq virusun nukleokapsidinin hüceyrə daxilinə sitoplazmaya keçməsinə imkan yaradır. Pillə 2: Virusun geriyə transkriptazası və başqa zülallar virusun bzRNT genomunun surətini iki-zəncirli DNT-yə köçürür. Pillə 3: Virusun izDNT-si nüvəyə daşınaraq sahib-hüceyrənin xromosom DNT-lərində mümkün olan çoxsaylı saytlardan birinə inteqrasiya edir. Sadəlik üçün, sahib-hüceyrənin yalnız bir xromosomu göstərilmişdir. Pillə 4: İntegrasiya etmiş virus DNT-si (provirus) sahib-hüceyrənin RNT polimerazası ilə transkripsiya olunaraq mRNT-ləri (tünd qırmızı) və virusun genom RNT molekullarını (parlaq qırmızı) yaradır. Sahib-hüceyrənin translyasiya maşını mRNT-ləri qlikozülallara və nukleokapsid zülallarına translyasiya edir. Pillə 5: Yeni nəsil virionlar sonra, Şəkil 5-46-də göstərildiyi kimi toplanaraq tumurcuqlama yolu ilə hüceyrədən azad olurlar.

Bəzi DNT virusları da sahib-hüceyrə xromosomuna inteqrasiya edə bilirlər. Məsələn insanın papilovirusları (HPVs), adətən ziyil və bəzi başqa dəri xoşxassəli şiş (benign) xəstəliyi kimi zədələri əmələ gətirirlər. Bu viruslar sahib orqanizmin genomuna inteqrasiya etmədən relikasiya edirlər. Amma, müəyyən HPV sterotiplərin genomları tədricən boyunun yoluxmuş epitel hüceyrələrinin xromosom DNT-nə integrasiya edib orada boyun xərçənginin inkişafına səbəb olurlar. Retroviruslardan və mötədil bakteriofaqlardan fərqli olaraq, bu inteqrasiyanı virus zülalları aparmır, əksinə bu, sahib hüceyrənin DNT reparasiyası prosesi nəticəsində baş verir. İnteqrasiya HPV üçün kor-sonluqdur. İnteqrasiya etmiş virus DNT replikasiya edə və yeni nəsil virionları yarada bilmir. Amma onkogen (xərçəng yaradan) virus zülalları inteqrasiya etmiş virus genomundan ekspressiya oluna bilir və xərçəngin yaranmasını inisiasiya edir. Müntəzəm Xırda qaralmaların (Routine Pap smears) əmələ gəlməsi HPV inteqrasiyası ilə başlanan transformasiya prosesinin başlanğıcında hüceyrələri aşkar edə bilər və xərçəng başlamazdan əvvəl ona qarşı effektli müalicə tədbiri görməyə imkan verər. Boyun xərçəngi ilə bağlı olan HPV tipləri üçün peyvənd (vaksin) hazırlanmışdır və bu viruslarla yoluxmanın əvvəlcədən qarşısını ala bilər və uyğun olaraq boyun xərçənginin inkişaf etməsini dayandıra bilər. Amma fərd artıq bu virusa tutulubsa onun "imkanlar pəncərəsi" artıq bağlanmışdır və peyvənd xərçəngin inkişafının qarşısını ala bilmir. Peyvənd 100 faiz effekiv olmadığından hətta peyvənd olunmuş qadınlar mütəmadi olaraq Xırda qaralmaların (Pap smears) testini etməlidirlər. ■

5.7 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Viruslar: Hüceyrənin Genetik Sisteminin parazitləri

- Viruslar kiçik parazitlər olub yalnız sahib-hüceyrələrdə replikasiya edə bilirlər. Virus genomları DNT (DNT viruslar) və ya RNT (RNT viruslar) formasında və birzəncirli və ya ikizəncirli ola bilirlər.
- Virus genomunu örtən kapsud bir və ya az sayda virusla kodlaşdırılan zülalların çoxsaylı nüsxələrindən təşkil olunub. Bəzi viruslarda həmçinin sahib hüceyrənin plazma membranına oxşar xarici qabıq olur, amma onda yalnız virus transmembran zülalları olur.
- Bitki və heyvan DNT viruslarının çoxu virus genomunun mRNT-yə transkripsiyası və yeni nəsil genomun istehsalı üçün sahib-hüceyrənin nüvə fermentlərinə ehtiyacı var. Bunun əksinə olaraq RNT virusların çoxu virus RNT genomunu virus mRNT-yə transkripsiya edən və virus RNT genomunun yeni nüsxələrini sintez edən fermentləri özləri kodlaşdırırlar.
- Sahib-hüceyrənin ribosomları, tRNT-ləri və translyasiya faktorları yoluxmuş hüceyrələrdə bütün virus zülallarının sintezində istifadə olunurlar.
- Litik virus yoluxması virus zülallarının adsorbsiyasına, penetrasiyasına, virus zülallarının sintezinə və yeni nəsil virionların genomunun sintezinə (replikasiya), yeni nəsil virusların toplanmasına və nəticədə sahib-hüceyrənin məhvinə aparan yüzlərlə və ya minlərlə virionların buraxılmasına səbə olur (bax Şəkil 5-45). Qabıqlı virusların buraxılması sahib hüceyrənin membranından tumurcuqlama yolu ilə baş verir (bax Şəkil 5-46).
- Qeyri litik yoluxma virus genomunun sahib-hüceyrənin DNT-nə inteqrasiya etməsi ilə baş verir və əsasən sahib-hüceyrənin ölümünə gətirib çıxarmır.
- Retroviruslar qabıqla örtülü olan və bir-zəncirli RNT genomuna malik olan heyvan viruslarıdır. Sahib-hüceyrə yoluxduqdan sonra, virionda olan virus fermenti geriyə transkriptaza virusun RNT genomunu iki-zəncirli DNT-yə çevirir, o da sonra virusla hüceyrəyə daxil olan inteqraza fermenti vasitəsilə xromosomal DNT-yə inteqrasiya edr (bax Şəkil 5-48).
- Başqa retruviruslarla olan yoluxmadan fərqli olaraq HIV-1 ilə yoluxma sonda sahib-hüceyrəni öldürür, QİÇS üçün xarakterik olan immun sisteminin çatışmazlığını əmələ gətirir.
- Onkogenlərə malik olan şiş virusları RNT genomuna (məsələn, insanın T-hüceyrəsinin limfotrofik virusu) və ya DNT genomuna (məsələn, insanın papilomavirusları) malik olurlar. Bu viruslarla yoluxmada, virus genomunun sahib-hüceyrənin xromosomuna inteqrasiyası hüceyrələri şiş hüceyrələrinə keçirir (transformasiya edir).

Açar Sözlər

antikodon
aparıcı zəncir
DNT polimeraza
fosfodiefir əlaqəsi
gecikən zəncir
gen konversiyası
genetik kod
geriyə transkriptaza
Hollidey quruluş
Homoloji rekombinasiya
ikiqat zəncir
izoforma
kəsiklərlə (eksesion) reparasiya sistemi
kodon
komplementarlq
məlumat RNT (mRNT)
mutasiya
nəqliyyat (transfer) RNT (tRNT)
oxunan çərçivə
Okazaki fraqmentləri
poliribosom
praymer
promotor
rekombinasiya
replikasiya çəngəli
retroviruslar
ribosom
ribosom RNTsı (rRNT)
RNT polimeraza
transkripsiya
translyasiya

Konsepsiyalara Baxış

1. Uotson-Krik əsas cütləri nədir? Nə üçün onlar mühümdür?
2. Plazmid DNT-nin sekvens üçün (iki-zəncirli, dairəvi) hazırlanmasına qısa, bir-zəncirli oliqonukleotid praymerlərin plazmid templeytə komplementar yapışması daxildir. Bu, adətən plazmid DNT-ni və praymeri 90°C qədər qızdırmaq və sonra tədricən 25°C endirməklə baş verir. Nə üçün bu protokol işləyir?
3. RNT və DNT arasında olan hansı fərqlər DNT-nin yüksək stabilliyini izah etməyə kömək edir? DNT-nin funksiyası üçün bunlardan nəyin olması vacibdir?
4. Prokariot və eukariot mRNT-lərin sintezində və quruluşunda əsas fərqlər hansılardır?
5. İnsanın xüsusi boy faktoru reseptorunun geninin funksiyasının tədqiqatı zamanı alimlər tapmişlar ki, bu gendən iki tip zülal sintez olunur. Membrana sarınan domenə malik olan daha böyük zülal, hüceyrə səthində boy faktorunun tanınmasında fəaliyyət göstərir və aşağıya istiqamətidə siqnal yolunu stimullaşdırır. Bunun əksinə olaraq kiçik zülal hüceyrədən ifraz olunur və qanda dövrə edən mövcud boy faktorlarına birləşməklə fəaliyyət göstərir və aşağıya istiqamətidə siqnal yolunu ingibirləşdirir. Hüceyrə necə olur ki, tamamilə fərqli bu iki zülalı sintez edir - fərziyə edin.
6. Çox bakterial genlərin transkripsiyası *operonlar* adlanan funksional qruplar şəkilində yeləşir, məsələn triptofan operonu (Şəkil 5-13a). Operon nədir? Genlərin operondakı düzülüşünün eukariotlardakı düzülüşlə müqayisədə hansı üstünlükləri var?
7. Poli-A-birləşdirən zülaldakı mutasiya translyasiyaya necə təsir edərdi? Belə mutantlarda poliribosomların elektron mikroskopundakı mikrofotosu normal formanın mikrfotosundan nə ilə fərqlənir?
8. DNT-nin hansı xüsusiyyəti bəzi DNT sintezinin kəsilməli olması tələbi ilə nəticələnir? Okazaki fraqmenti və DNT liqaza hüceyrə tərəfindən necə istifadə olunur?
9. Eukariotlar surətin köçürməsində baş verən səhvlər və mutagenlərin təsiri nəticəsində əmələ gələn mutasiyalara mane olan reparasiya sistemlərinə malikdirlər. Eukariotlarda hansı üç kəsilmələrlə (excision)-reparasiya sistemləri tapılmışdır və bunlardan hansı, ultra bənövşəyi şüalar vasitəsi ilə DNT-də əmələ gələn timin-timin dimerlərini bərpa edir?
10. Yüksək tezlikli mutasiyaların baş verməsinin əksinə olaraq, DNT-nin reparasiya sistemi normal hüceyrədə genomun doğruluğunun qorunub saxlanmasına cavabdehdir. Hansı DNT mutasiyası (a) UV şüalandırma ilə və (b) ionlaşdırıcı radiasiya ilə əmələ gəlir? Məməlilərin hüceyrələrində bu mutasiyalardan hər birinin hansı sistemlə bərpa olunduğunu izah edin. Nəyə görə bir və ya daha artıq DNT reparasiya sistemlərindəki funksiyanın itirilməsi xərçənglərin əmələ gəlməsi üçün tipik olduğunu izah edin.
11. DNT zədələnmələrini bərpa edən və genetik müxtəlifliyi əmələ gətirən prosesə nə ad verilmişdir? İki prosesin oxşar və fərqli cəhətlərini qısaca təsvir edin.
12. Retrovirusların genomu sahib-hüceyrənin genomuna inteqrasiya edə bilir. Hansı gen retroviruslar üçün unikaldır, və nə üçün bu genlə kodlaşdırılan zülal retrovirusların həyat tsiklinin qorunub saxlanılması üçün mütləq vacibdir? Bir sıra retroviruslar bəzi insan hüceyrələrini yoluxdura bilir. Onlardan ikisini göstərin, bu yoluxmalara qarşı istifadə olunan tibbi ləvazımatları qısaca təsvir edin, və nədən yalnız müəyyən hüceyrələrin yoluxduğunu izah edin.
13. **a**. Əgər DNT zəncirlərinin açılması göstərilən istiqamətdə gedərsə aşağıdakı DNT zəncirlərindən hansı – yuxarıdakı, yoxsa aşağıdakı RNT transkripsiyası üçün templeyt rolunu oynayacaq?

5′-ACGGACTGTACCGCTGAAGTCATGGACGCTCGA-3′
3′-TGCCTGACATGGCGACTTCAGTACCTGCGAGCT-5′

DNT açılmasının istiqaməti →

b. Nəticədə əmələ gəlmiş RNT ardıcıllığı necə olacaq (5′-dən 3′ istiqamətdə yazılmış)?
14. Prokariot və eukariot genlərinin xüsusiyyətləri arasındakı ziddiyyətləri təsvir edin.
15. DNT replikasiyası və onun mərkəzi ehkamı ətrafında gedən hadisələri öyrəndiniz. Bu proseslə bağlı olan, və aşağıdakı hadisələrə (senarilərə) mənfi təsir edən mərhələləri təyin edin.

a. Helikaza DNT-nin ikiqat zəncirini açır, amma stabilləşdirici zülallar mutasiya olunublar və DNT-yə bağlana (birləşə) bilmirlər.

b. mRNT molekulu, öz-özündə komplementar əsas cütü yaradaraq AUG start saytı ətrafında sarınan sancaq quruluşlu ilgək əmələ gətirir.

c. Hüceyrə funksional $tRNT_i^{Met}$ yaratmaq imkanına malik deyil.

16. Aşağıda göstərilmiş açardan istifadə edərək verilmiş DNT ardıcıllığından əmələ gələn polipeptidin aminturşu ardıcıllığını təyin edin. Qeyd: Açarda olan amin turşularının hamısı istifadə olunmayacaq.

5′-TTCTAAACGCATGAAGCACCGTCTCAGAGCCAGTGA-3′
3′-AAGATTTGCGTACTTCGTGGCAGAGTCTCGGTCACT -5′

DNT açılmasının istiqaməti →

Asn = AAU Cys = TCG Gly = CAG His = CAU Lys =AAG
Met=AUG Phe = UUC Ser=AGC Tyr=UAC Val=GUC; GUA

17. a. Yuxarıdakı şəkilə baxın. Nəyə görə gecikən zəncir yarandıqca Okazaki fraqmentlərinin (davam edən uzun zəncirin əvəzinə) əmələ gəlməsinin lazım olduğunu izah edin.

b. Əgər DNT polimeraza yuxarıdakı şəkildə yalnız aşağıdakı templeyt zəncirə bağlanırsa, hansı şərait(lər)də aparıcı zənciri yarada biləcək?

18. DNT reparasiya sistemləri yeni sintez olunmuş zənciri üstünlüklə hədəf edir. Bunun əhəmiyyəti nədir?
19. Aşağıda nöqtəvi mutasiyanın xüsusi tiplərini göstər (siz RNT ardıcıllığının birbaşa DNT versiyasını görürsünüz).

Orjinal ardıcıllıq: 5′AUG TCA GGA CGT CAC TCA GCT 3′
Mutasiya A: 5′AUG TCA GGA CGT CAC TGA GCT 3′
Mutasiya B: 5′AUA TCA GGA CGT CAC TCA GCT 3′

20. a. Litik və qeyri-litik virus yoluxmalarının əsas fərqlərini açıb gstərin və hər birinə nümunələr verin.

b. Növbəti proseslərdən hansılar həm litik həm də qeyri litik yoluxmalarda baş verir?

(i) Yoluxmuş hüceyrə partlayaraq virusları buraxır (azad edir).
(ii) Virus mRNT-si sahib-hüceyrənin transkripsiya maşını ilə transkripsiya olunur.
(iii) Virus zülalları və nuklein turşuları bükülərək virionları əmələ gətirirlər.

İstinadlar

Nuklein Turşularının Quruluşu

Arnott, S. 2006. Historical article: DNA polymorphism and the early history of the double helix. *Trends Biochem. Sci.* **31**:349–354.

Berger, J. M., and J. C. Wang. 1996. Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **6**:84–90.

Cech, T. R. 2009. Evolution of biological catalysis: ribozyme to RNP enzyme. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **74**:11–16.

Dickerson, R. E. 1992. DNA Structure from A to Z. *Meth. Enzymol.* **211**:67–111.

Kornberg, A., and T. A. Baker. 2005. *DNA Replication.* University Science, chap. 1.

Lilley, D. M. 2005. Structure, folding and mechanisms of ribozymes. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **15**:313–323.

Vicens, Q., and T. R. Cech. 2005. Atomic level architecture of group I introns revealed. *Trends Biochem. Sci.* **31**:41–51.

Wang, J. C. 1980. Superhelical DNA. *Trends Biochem. Sci.* **5**:219–221.

Wigley, D. B. 1995. Structure and mechanism of DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struc.* **24**:185–208.

Zülal Kodlaşdıran Genlərin Transkripsiyası və Funksional mRNT-nin Formalaşması

Brenner, S., F. Jacob, and M. Meselson. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* **190**:576–581.

Brueckner F., J. Ortiz, and P. Cramer. 2009. A movie of the RNA polymerase nucleotide addition cycle. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **19**:294–299.

Murakami, K. S., and S. A. Darst. 2003. Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **13**:31–39.

Okamoto K., Y. Sugino, and M. Nomura. 1962. Synthesis and turnover of phage messenger RNA in E. *coli* infected with bacteriophage T4 in the presence of chloromycetin. *J. Mol. Biol.* **5**:527–534.

Steitz, T. A. 2006. Visualizing polynucleotide polymerase machines at work. *EMBO J.* **25**:3458–3468.

mRNT Kodunun tRNT-lərlə Açılması

Alexander, R. W., and P. Schimmel. 2001. Domain-domain communication in aminoacyl-tRNA synthetases. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **69**:317–349.

Hatfield, D. L., and V. N. Gladyshev. 2002. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol. Cell Biol.* **22**:3565–3576.

Hoagland, M. B., et al. 1958. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **231**:241–257.

Ibba, M., and D. Soll. 2004. Aminoacyl-tRNAs: setting the limits of the genetic code. *Genes & Dev.* **18**:731–738.

Khorana, G. H., et al. 1966. Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**:39–49.

Nakanishi, K., and O. Nureki. 2005. Recent progress of structural biology of tRNA processing and modification. *Mol. Cells* **19**:157–166.

Nirenberg, M., et al. 1966. The RNA code in protein synthesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**:11–24.

Rich, A., and S.-H. Kim. 1978. The three-dimensional structure of transfer RNA. *Sci. Am.* **240**(1):52–62 (offprint 1377).

Zülalların Ribosomlarda Pillələrlə Sintezi

Ban N., et al. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**:905–920.

Belousoff, M. J., et al. 2010. Ancient machinery embedded in the contemporary ribosome. *Biochem. Soc. Trans.* **38**:422–427.

Frank, J., and R. L. Gonzalez, Jr. 2010. Structure and dynamics of a processive Brownian motor: the translating ribosome. *Ann. Rev. Biochem.* **79**:381–412.

Jackson, R.J., et al. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **11**:113–127.

Korostelev, A., D. N. Ermolenko, and H. F. Noller. 2008. Structural dynamics of the ribosome. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**:674–683.

Livingstone, M., et al. 2010. Mechanisms governing the control of mRNA translation. *Phys. Biol.* **7**(2):021001

Sarnow, P., R. C. Cevallos, and E. Jan. 2005. Takeover of host ribosomes by divergent IRES elements. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:1479–1482.

Steitz, T. A. 2008. A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **9**:242–253.

Wimberly, B. T., et al. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**:327–339.

Yusupova, G. and M. Yusupov. 2014. High-resolution structure of the eukaryotic 80S ribosome. *Ann. Rev. Biochem.* **83**:467–486. http://www.annualreviews.org/doi/suppl/10.1146/annurev-biochem-060713-035445.

DNT Replikasiyası

DePamphilis, M. L., ed. 2006. *DNA Replication and Human Disease*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Gai, D., Y. P. Chang, and X. S. Chen. 2010. Origin DNA melting and unwinding in DNA replication. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **20**(6):756–762.

Kornberg, A., and T. A. Baker. 2005. *DNA Replication.* University Science.

Langston, L. D., C. Indiani, and M. O′Donnell. 2009. Whither the replisome: emerging perspectives on the dynamic nature of the DNA replication machinery. *Cell Cycle 8*:2686–2691.

Langston, L. D., and M. O′Donnell. 2006. DNA replication: keep moving and don′t mind the gap. *Mol. Cells* **23**:155–160.

Schoeffler, A. J., and J. M. Berger. 2008. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Quart. Rev. Biophys.* **41**:41–101.

Stillman, B. 2008. DNA polymerases at the replication fork in eukaryotes. *Cell* **30**:259–260.

DNT Reparasiyası və Rekombinasiyası

Andressoo, J. O., and J. H. Hoeijmakers. 2005. Transcriptioncoupled repair and premature aging. *Mutat. Res.* **577**:179–194.

Barnes, D. E., and T. Lindahl. 2004. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Ann. Rev. Genet.* **38**:445–476.

Bell, C. E. 2005. Structure and mechanism of *Escherichia coli* RecA ATPase. *Mol. Microbiol.* **58**:358–366.

Friedberg, E. C., et al. 2006. DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair* **5**:986–996.

Haber, J. E. 2000. Partners and pathways repairing a doublestrand break. *Trends Genet.* **16**:259–264.

Jiricny, J. 2006. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:335–346.

Khuu, P. A., et al. 2006. The stacked-X DNA Holliday junction and protein recognition. *J. Mol. Recog.* **19**:234–242.

Lilley, D. M., and R. M. Clegg. 1993. The structure of the four-way junction in DNA. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struc.* **22**:299–328.

Mirchandani, K. D., and A. D. D′Andrea. 2006. The Fanconi anemia/BRCA pathway: a coordinator of cross-link repair. *Exp. Cell Res.* **312**:2647–2653.

Mitchell, J. R., J. H. Hoeijmakers, and L. J. Niedernhofer. 2003. Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and aging. *Curr. Opin. Cell Biol.***15**:232–240.

Orr-Weaver, T. L., and J. W. Szostak. 1985. Fungal recombination. *Microbiol. Rev.* **49**:33–58.

Shin, D. S., et al. 2004. Structure and function of the double strand break repair machinery. *DNA Repair* **3**:863–873.
Wood, R. D., M. Mitchell, and T. Lindahl. Human DNA repair genes. *Mutat. Res.* **577**:275–283.
Yoshida, K., and Y. Miki. 2004. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* **95**:866–871.

Viruslar: Hüceyrənin Genetik Sistemlərinin Parazitləri

Flint, S. J., et al. 2000. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control.* ASM Press.
Hull, R. 2002. *Mathews' Plant Virology*. Academic Press.
Klug, A. 1999. The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **354**:531–535.
Knipe, D. M., and P. M. Howley, eds. 2012. *Fields Virology*, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins.
Kornberg, A., and T. A. Baker. 1992. *DNA Replication*, 2d ed. W. H. Freeman and Company. Good summary of bacteriophage molecular biology.

Sağdakı siçanda kataraks vardır, çünki o qamma-kristallin genin dominant mutant allelinin bir nüsxəsini daşıyır. Normal gözlərə malik olan soldakı siçan mutant allellərin CRISPR-Cas9 genom-redaktə metodu ilə geriyə, təbii forma vəziyyətinə düzəliş edilmiş ziqotdan əmələ gəlmişdir. [Jinsong L.]

FƏSİL

6

Molekulyar Genetik Metodlar

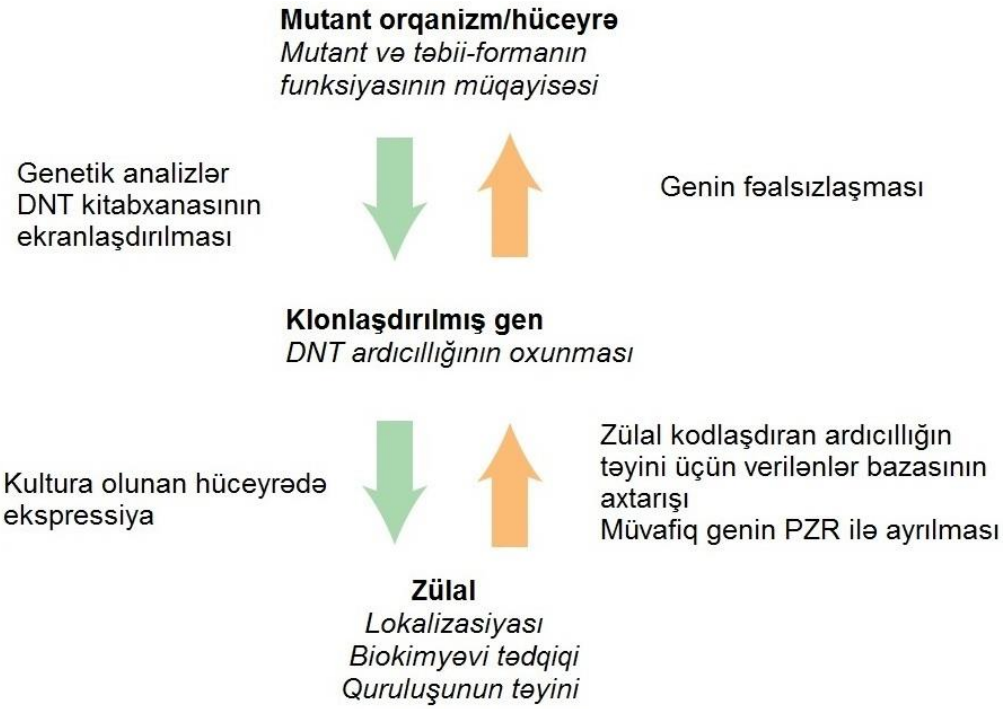
Özünün ən əsas təməl elementləri çərçivəsinə qədər kiçilən molekulyar hüceyrə biologiyası sahəsində, biz hüceyrənin əsasında kimyəvi və molekulyar mexanizmlər duran bioloji davranışı dərk etməyə çalışırıq. Çox hallarda yeni molekulyar proseslərin tədqiqatı xüsusi bir zülalın və ya zülallar dəstinin fəaliyyəti üzərində qurulur. Yeni aşkar olunmuş zülal barədə hüceyrə bioloqları adətən üç fundamental sualı soruşurlar: Canlı hüceyrə kontekstində bu zülalın funksiyası nədən ibarətdir? Təmizlənmiş zülalın biokimyəvi funksiyası nədən ibarətdir? Zülal harada yerləşir? Bu suallara cavab vermək üçün molekulyar bioloqlar üç molekulyar-genetik alətdən istifadə edirlər: bu zülalı kodlaşdıran genin, funksional zülalın olmadığı mutant orqanizmin və ya mutant hüceyrə xətti, və biokimyəvi tədqiqatlar üçün təmizlənmiş zülal mənbəyi. Bu fəsildə, biz hər üç alətin alınması üçün iki əsas eksperimental strategiyanın müxtəlif aspektlərini müzakirə edirik (Şəkil 6-1).

Birinci strategiya çox hallarda ***klassik genetika*** kimi əsaslandırılır və maraq daxilində olan bəzi proseslər üzrə qüsurlu mutantların ayrılması ilə başlanır. Sonra genetik metodlar təsir olunmuş genlərin ayrılması və identifikasiyası üçün istifadə olunur. Ayrılmış gen, biokimyəvi eksperimentlər üçün və kodlaşdırılan zülalın orqanizmdə harada və nə vaxt ekspressiya olunduğunu öyrənmək üçün probların dizayn olunması məqsədi ilə böyük miqdarda zülalın alınmasında məharətlə istifadə oluna bilər. İkinci strategiya, klassik yanaşma kimi eyni mərhələləri əhəmiyyətli şəkildə, amma geriyə doğru ardıcıllıqla keçərək davam edir və maraq daxilində olan zülalın ayrılması və ya orqanizmin genom ardıcıllığına əsaslanaraq onun identifikasiyası ilə başlanır. Müvafiq gen ayrıldıqdan sonra, onda müəyyən dəyişikliklər aparılıb yenidən orqanizmə keçirilə bilir. Hər iki strategiyada, xüsusi bir geni fəalsızlaşdıran mutasiyanın fenotipik əhəmiyyətini (zəruriliyini) öyrənilməklə genetiklər kodlaşdırılan zülalın ardıcıllığı, quruluşu, və biokimyəvi fəallıqları barədə bilikləri onların canlı hüceyrədəki və ya çoxhüceyrəli orqanizmlərdəki funksiyaları ilə birləşdirə bilirlər.

Zülalların və onların funksiyalarının öyrənilməsi üçün hər iki strategiyanın əhəmiyyətli komponenti müvafiq genin ayrılmasıdır. Beləliklə, biz tədqiqatçıların orqanizmin DNT-sinin spesifik nahiyələrinin ayrılmasında, onun ardıcıllığının oxunmasında və manipulyasiyasında istifadə etdikləri müxtəlif metodları müzakirə edirik. Sonra biz, xüsusi bir genin harada və na vaxt ekspressiya olunduğunu və onun kodlaşdırdığı zülalın hüceyrə daxilində harada yerləşdiyini analiz etmək üçün ümumi istifadə olunan müxtəlif metodları təqdim edirik. Bəzi hallarda, zülalların funksiyası barədə biliklər tibbi əhəmiyyətli imkişafa aparır və irsən keçmiş xəstəliklərin müalicəsinin inkişafı istiqamətində atılan ilk pillə, bizim burada muzakirə etdiyimiz, təsirə məruz qalmış genin ayrılması və identifikasiyasıdır. Nəhayət, biz hüceyrədə zülalların rolunu müəyyən etmək məqsədi ilə zülalların normal funksiyasını pozmaq üçün istifadə olunan metodları müzakirə edirik.

QISA İCMAL

6.1 Genlərin Öyrənilməsi və İdentifikasiyasında Mutasiyaların Genetik Analizi
6.2 DNT-nin Klonlaşdırılması və Xarakteristikası
6.3 Genlərin Ekspressiyasının Öyrənilməsində Klonlaşdırılmış DNT Fraqmentinin İstifadə Olunması
6.4 Insan Xəstəliyi Genlərinin Müəyyənləşdirilməsi və Yerinin Təyini
6.5 Eukariotlarda Xüsusi Genlərin Funksiyasının Dayandırılması



ŞƏKIL 6-1 Gen məhsullarının quruluşlarını, lokalizasiyasını fə funksiyasını tənzimləyən iki strategiyaya ümumi baxış. Mutant orqanizm klassik genetik strategiyanın başlanğıc nöqtəsidir (yaşıl oxlar). Tərsinə strategiya (narıncı oxlar) adətən, genom-ardıcıllığı verilənlər bazasının analizindən istifadə etməklə zülal-kodlaşdıran ardıcıllıqların identifikasiyası ilə başlayır. Hər iki strategiyada, əsil gen ya DNT kitabxanasından ayrılır ya da xüsusi amplifikasiya yolu ilə genom DNT-sinin gen ardıcıllığından ayrılır. Klonlaşdırılmış gen ayrıldıqdan sonra, o kodlaşdırılan zülalın bakteriyal və ya eukariotik ekspressiya sistemləri vasitəsi ilə istehsalında istifadə oluna bilər. Alternativ olaraq, klonlaşdırılmış gen, müxtılif metodların biri ilə fəalsızlaşdırıla bilər və mutant hüceyrə və ya orqanizmlərin alınmasında istifadə oluna bilər.

6.1 Genlərin Öyrənilməsi və İdentifikasiyasında Mutasiyaların Genetik Analizi

Fəsil 5-də təsvir olunduğu kimi, genlərin DNT ardıcıllığında kodlaşdırılan məlmat hüceyrədə olan hər bir zülal molekulunun ardıcıllığını və uyğun olaraq onun quruluşunu və funksiyasını müəyyən edir. Hüceyrə və orqanizmlərin öyrənilməsi zamanı bir alət kimi genetikanın gücü tədqiqatçıların hüceyrədə xüsusi bir tip zülalın hər bir surətini onun genində dəyişiklik etməklə selektiv olaraq dəyişdirmək imkanındadır. Müəyyən bir proses üzrə qüsurlu olan mutantların genetik analizləri (a) prosesin getməsi üçün yeni genlərin tələb olunmasını, b) bu proses zamanı gen məhsullarının təsir etmə ardıcıllığını və (c) başqa genlərlə kodlaşdırılan zülalların bir-biri ilə qarşılıqlı təsirdə olub-olmamalarını göstərə bilər. Bu tip genetik tədqiqatların hüceyrənin mürəkkəb inkişaf proseslərinin mexanizminə necə anlayışlar verə biləcəyinə baxmazdan öncə biz bütün müzakirələrimiz boyu istifadə olunan əsas genetik terminləri nəzərdən keçirək.

Genin müxtəlif formaları və ya variantları onun **allelləri** hesab olunur. Populyasiyada və xüsusən də insan populyasiyasında mövcud olan, təbii genetik variantları genetiklər bir qayda olaraq allel adlandırırlar. Mutasiya termini adətən o hallar üçün istifadə olunur ki, allel yeni formalaşır, məsələn eksperimental işlər zamanı orqanizmlərə, onlarda DNT ardıcıllığında nəsilə ötürülə bilən dəyişikliklərə səbəb olan maddələrlə - **mutagenlərlə** təsir zamanı yaransın.

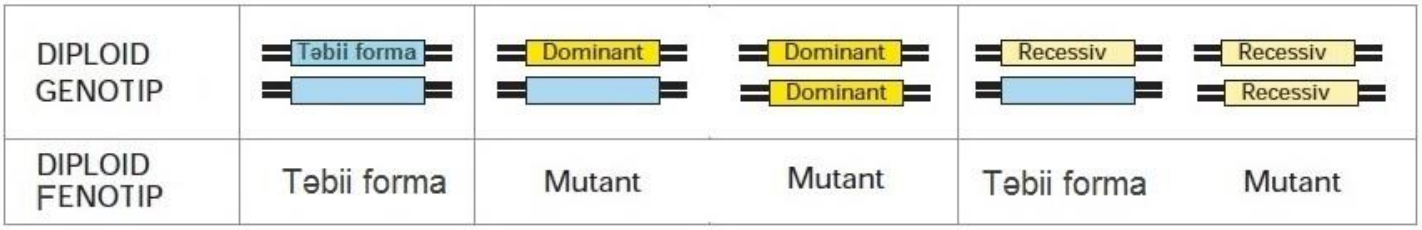
Dəqiq desək, fərdin malik olduğu bütün genlərin allellərinin mövcud olan dəsti onun genotipini təşkil edir. Amma, bu termin əksər hallarda, daha məhdud mənada araşdırılan xüsusi gen və ya genlər qurupunun allelərini göstərmək üçün istifadə olunur. Eksperimental orqanizmlərdə təbii forma termini çox hallarda, aparılan eksperimentlərdə müqayisə üçün nəzarət kimi istifadə olunan standart genotipə

deyilir. Beləliklə, normal, qeyri mutant allel təbii formanı bildirəcək. İnsan populyasiyasında təbii şəkildə meydana gəlmiş böyük miqdarda allel variasiyaları mövcud olduğundan *təbii forma* adətən bütün alternativ formalar arasında daha çox tezlikdə rast gəlinən allel hesab olunur.

Genetiklər orqanizmlərin *genotipi* və fenotipi arasında əhəmiyyətli fərqləri meydana çıxarırlar. Fenotip verilmiş fərdin onun genotipinə əsasən meydana gəlmiş bütün fiziki atributları və ya əlamətləri hesab edilir. Amma, praktikada *fenotip* terminiu çox hallarda eksperimental tədqiqatda istifadə olunan allellərin əmələ gətirdiyi fiziki nəticəni bildirmək üçün istifadə olunur. Asanlıqla müşahidə oluna bilən fenotipik xüsusiyyətlər mutasiyanın genetik analizi zamanı çox böyük əhəmiyyətə malikdir.

Genlərin Funksiyasında Resessiv və Dominant Mutant Allellər Əsasən Əks Təsirə Malik Olurlar

Eksperimental orqanizmlər arasında fundamental genetik fərq onların hüceyrələrinin hər bir xromosomun iki nüsxəsinə mi, yoxsa hər bir xromosomun yalnız bir nüsxəsinə malik olmalarındadır. Birincilər *diploid* hesab olunurlar, sonunculara isə *haploid* deyilir. Əksər mürəkkəb çoxhüceyrəli orqanizmlər (məsələn meyvə milçəyi, siçan, insan) diploiddirlər, amma bəzi birhüceyrəli sadə orqanizmlər haploiddirlər. Bəzi orqanizmlər, xüsusən maya göbələyi *Sacharomyces cervisiae*, həm haploid həm də diploid orqanizm kimi mövcud ola bilirlər. Həm bitkilər həm də heyvanlar arasında bəzi orqanizmlərin normal hüceyrələri hər bir xromosomun ikidən artıq surətinə malik olur və ona görə də onlar *poliploid* adlanırlar. Bundan əlavə, xərçəng hüceyrələri diploid hüceyrələr kimi başlanğıc götürürlər və xəırçəng hüceyrələrinə transformasiya olunma prosesi zamanı bir və ya daha artıq xromosomun əlavə nüsxələrini qazanırlar və ona görə də onlar *aneuploid* adlandırılırlar. Amma, bizim genetik metodlar və analizlər üzrə müzakirəmiz diploid orqanizmlərə, o cümlədən diploid maya göbələklərinə aid olacaq.



ŞƏKIL6-2 Diploid orqanizmlərdə dominant və resessiv mutant allellərin fenotipə təsiri. Dominant allelin bir surəti mutant fenotipi əmələ gətirmək üçün kifayət edir, amma mutant fenotipi əmələ gətirmək üçün resessiv allelin hər iki surəti tələb olunur. Resessiv mutasiya adətən funksiyanın itirilməsinə səbəb olur, dominant mutasiya isə funksiyanın bərpasına və ya funksiyanın dəyişməsinə səbəb olur.

Baxmayaraq ki, genin müxtəılif allelləti populyasiyada müxtəlif orqanizmlərdə meydana çıxa bilər, istənilən diploid orqanizm hər bir genin iki nüsxəsinə malik olacaq və beləliklə iki müxtəlif allelə malik olacaq. İki müxtəlif allelə malik olan fərd həmin genə görə **heterozigotdur**, amma eyni (identik) allellərə malik olan fərd verilmiş genə görə **homozigot**dur. **Resesiv** mutant allel o allel hesab olunur ki, mutant fenotipin müşahidə olunması üçün fərdin hər iki alleli mutant olsun və ona görə də mutant fenotipi əmələ gətirmək üçün fərd mutant allelə görə homoziqot olmalıdır. Bunun əksinə olaraq, **dominant** mutant allelin fenotipik nəticələri bir mutant və bir təbii (normal) allelə malik olan hetereziqot fərdlərdə müşahidə olnmacaqdır (Şəkil 6.2).

Mutant allelin resesiv və ya dominant olmasından asılı olaraq təsir olunan genin funksiyası və buna səbəb olan mutasiyanın təbiəti barədə əhəmiyyətli məlumatı əldə etmək mümkündür. Resesiv allellər adətən təsir olunan geni fəalsızlaşdıran və ***funksiyanın*** qismən və ya tamamilə ***itirilməsinə*** gətirib çıxaran mutasiyaların nəticəsində əmələ gəlir. Bu cürə resessiv mutasiya verilmiş genin bütövlikdə və ya onun hissələrinin xromosomdan uzaqlaşdırılmasına, genin ekspressiyasının qırılmasına səbəb olur, və ya kodlaşdırılan zülalın quruluşunu dəyişir və beləliklə onun funksiyasını dəyişir. Bunun əksinə olaraq, dominant allellər çox hallarda ***funksiyanın qazanılmasına*** sabəb olan mutasiyaların nəticəsində yaranır. Bu cürə dominant mutasiyalar kodlaşdırılan zülalın fəallığını artıra bilir və ya ona yeni fəllıq verə bilir, ya da ki, onun ekspressiyasının yeni bir məkan və ya zaman profilinə səbəb olur.

Bəzi nadir hallarda, müəyyən genlərdə dominant mutasiyalar funksiyanın itirilməsi ilə nəticələnir. Məsələn, bəzi genlər ***haplo-yetərsiz*** (***haplo-insufficient***)-dir, belə genlərdə iki alleldən birinin atılması və ya fəalsızlaşdırılması nəticəsində kifayət qədər gen məhsulu istehsal olunmadığından mutant fenotipin yaranmasına səbəb olur. Başqa, nadir rast gəlinən misal, bir allelin dominant mutasiyası, başqa bir allelin məhsulu olan təbii formalı zülalın funklsiyası ilə qarşılıqlı əlaqədə olan zülalın quruluşunda dəyişikliyə səbəb olur. Bu cürə mutasiya ***dominant-neqativ*** hesab olunur, və funksiyanın-itirilməsi mutasiyasından alınan fenotipə bənzər fenotipi əmələ gətirir.

Bəzi allellər həm dominant həm də resessiv xüsusiyyətə malik olur. Belə hallarda, allelin resessiv və ya domionant olması fenotipi müəyyən edir. Məsələn, insanlarda hemoqlobin geninin Hb^s kimi göstərilən alleli birdən artıq fenotipik nəticəyə malikdir. Bu allelə görə homoziqot (Hb^s/Hb^s) olan fərdlər oraqvari-hüceyrələirin anemiyası - zəiflik, yorğunluq xəstəliyiunə malik olurlar, amma heteroziqot fərdlər (Hb^s/Hb^a) bu xəstəliyə malik olmurlar. Ona görə də Hb^s orqvari-

hüceyrələrin anemiyası əlaməti üzrə resessiv olur. Digər tərəfdən, hetereziqot (***Hb***^{s}/***Hb***^{a}) fərdlər homoziqot (***Hb***^{s}/***Hb***^{s}) fərdlərə nisbətən malariyaya qarşı daha davamlı olurlar, bu onu göstərdir ki, ***Hb***^{s} malariaya davamlılıq (resistantlıq) əlaməti üzrə ***dominantdır***.

Eksperimental orqanizmlərdə mutasiyanı induksiya etmək üçün çox istifadə olunan ümumi vasitə (mutagenez) etilmetan sulfonatdır (EMS). Hərçənd ki, bu mutagen bir neçə yolla DNT ardıcıllığını dəyişə bilir, amma onun daha ümumi olan təsir yolu DNT-də quanin nukleotidini kimyəvi modifikasiya etməkdir, nəticə etibarı ilə o G-C əsas cütlərinin A-T əsas cütlərinə çevrilməsinə səbəb olur. Genin ardıcıllığında bu cürə, yalnız tək bir əsas cütündə baş verən dəyişiklik **nöqtəvi mutasiya** adlanır. ***Susan*** nöqtəvi mutasiya zülalın aminturşu ardıcıllığında və ya genin kodlaşdırdığı zülalın fəallığında heç bir dəyişikliyə səbəb olmur. Amma, zülalın fəallığındakı dəyişikliklə əmələ gələn müşahidə oluna bilən fenotipik nəticə, bir amin turşusunun başqası ilə əvəz olunması (***missens mutasiya***), stop kodonun vaxtından əvvəl daxil edilməsi (***nonsens mutasiya***) və ya genin açıq oxunan çərçivəsindəki dəyişiklik (***çərçivənin sürüşməsi mutasiyası***) ilə baş verən nöqtəvi mutasiyadan yarana bilər. Zülalın fəallığının azalmasına səbəb olan DNT ardıcıllığındakı dəyişiklik zülalın fəallığının artmasına və ya onun kəmiyyət dəyişməsinə aparan dəyişiklikdən daha çox mümkün olduğundan **mutagenez** adətən dominant mutasiyalara nisbətən daha çox resesiv mutasiyaları yaradır.

Seleksiya Eksperimentlərində Mutasiyanın Seqreqasiyası Onların Dominantlığını və ya Resessivliyini Aşkar Edir

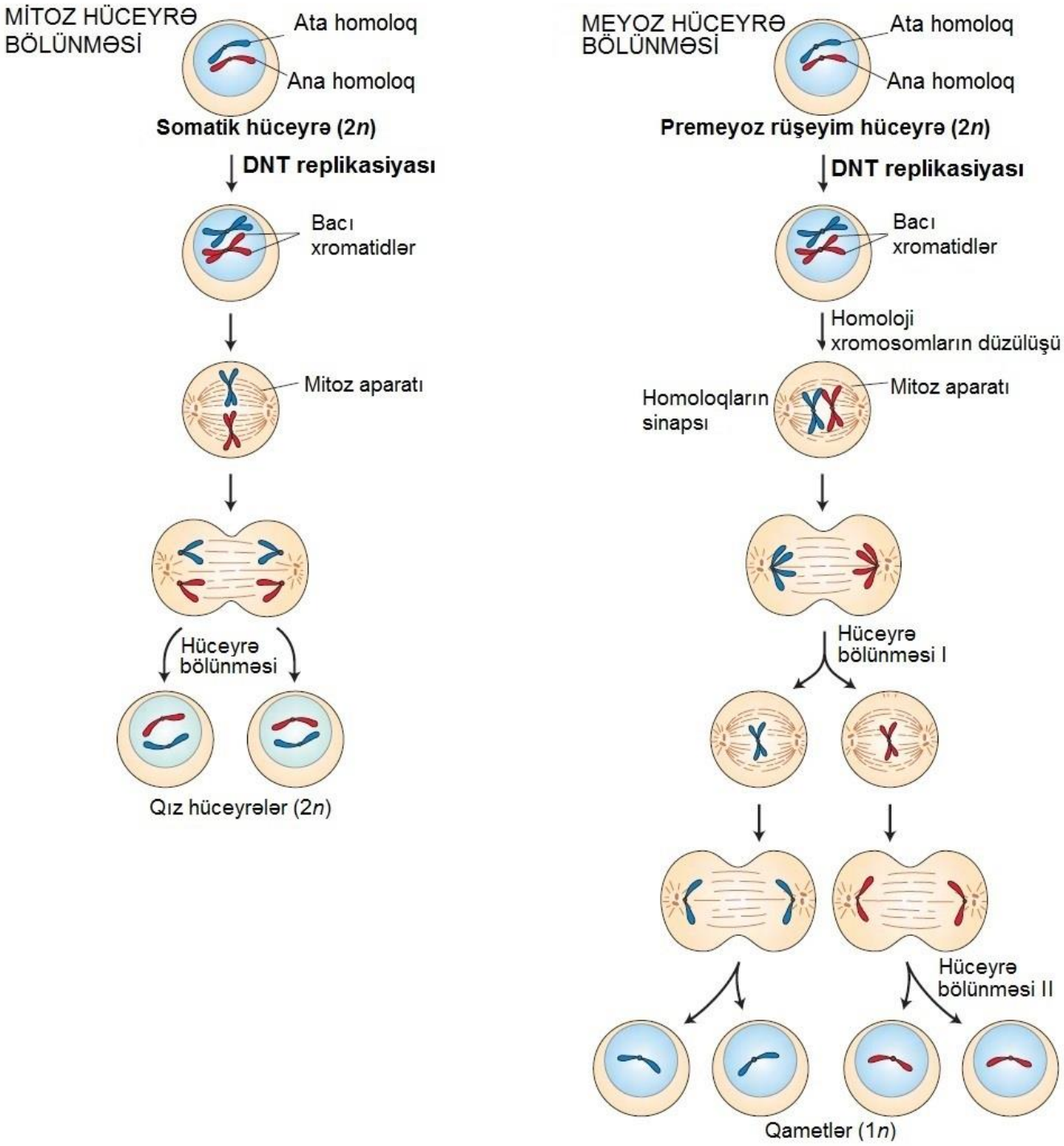
Genetiklər allellərin dominantlığını və ya resessivliyini yoxlamaq üçün orqanizmlərin normal həyat tsiklini istifadə etmişlər. Bunun necə baş verdiyini öyrənmək üçün, bizə ilk növbədə, qametlərin (ali bitkilərdə və heyvanlarda sperma və yumurta hüceyrələri) əmələ gəlməsinə səbəb olan hüceyrə bölünməsinə baxmaq lazımdır. Əksər çoxhüceyrəli orqanizmlərin əsas bədən (somatik) hüceyrələri mitozla bölündüyü halda qametlərin əmələ gəlməsinə səbəb olan rüşeyim hüceyrələrinin bölünməsi meyoz yolu ilə baş verir. Somatik hüceyrələrdə olduğu kimi, premeyoz rüşeyim hüceyrələri diploiddirlər və xromosomların morfoloji tipinin hər birindən iki homoloqa malik olurlar. Hər bir homoloji xromosom cütünü təşkil edən iki homoloqun hər biri müxtəlif valideyinlərdən alınmışdır və beləliklə də onların genləri müxtəlif (fərqli) allel formalarda mövcud ola bilərlər. Şəkil 6-3 mitoz və meyoz hüceyrə bölünmələrinin əsas gedişini göstərir. Mitoz zamanı DNT-nin replikasiyasının ardınca həmişə hüceyrənin bölünməsi baş verir və iki yeni qız hüceyrə əmələ gəlir. Meyoz zamanı isə DNT-nin replikasiyasının *bir* dövrəsinin ardınca iki ayrıca hüceyrə bölünməsi baş verir və hər bir homoloji cütdən yalnız bir xromosoma malik olan dörd haploid (1*n*) hüceyrələr əmələ gəlir. Birinci meyoz bölünmə zamanı replikasiya olunmuş homoloji xromosomların qız hüceyrələrə mütənasib paylanması və ya **ayrılması** (**seqreqasiyası**) təsadüfi baş verir; ona görə də ata və ana tərəfindən alınmış homoloqlar bir-birindən asılı olmayaraq ayrılırlar (seqreqasiya edirlər) və ana və ata xromosomların müxtəlif qatışıqlarından ibarət olan yeni qız hüceyrələrini əmələ gətirirlər.

Lazım olmayan mürəkkəbliklərdən yan keçmək üçün genetiklər adətən seleksiya eksperimentlərini öyrənilən genlər üzrə homoziqot olan ştammlar üzərində aparmağa cəhd edirlər. Bu cürə ***təmiz-nəsil ştammları***nda hər bir fərd hər valideyndən eyni alleli alacaq və ona görə də allellərin tərkibi bir nəsildən başqasına keçərkən dəyişməyəcək. Təmiz-nəsil mutantı təbii formalı təmiz-nəsil ştammı ilə cütləşdikdə bütün birinci övlad (F_1) nəsil heteroziqot olacaqlar (Şəkil 6-4). Əgər F_1 nəsil mutant əlaməti nümayiş etdirirsə, onda mutant allel dominantdır, əgər F_1 nəsil təbii forma əlamətini göstərirsə onda mutant allel resessivdir. F_1 fərdlər arasında sonrakı çarpazlaşdırmalar da həmçinin mutasiyanın dominant və ya resessiv olmasından asılı olaraq irsiyyətin fərqli profilini aşkar edəcəklər. Dominant allel üçün hetereziqot olan F_1 fərdlər öz aralarında çarpazlaşarkən alınan F_2 nəsilin dörddə üçü mutant əlaməti nümayiş etdirəcək. Bunun əksinə, resessiv allel üçün hetereziqot olan F_1 fərdlər öz aralarında çarpazlaşarkən əmələ gələn F_2 nəsilin yalnız dörddə biri mutant əlaməti göstərəcək.

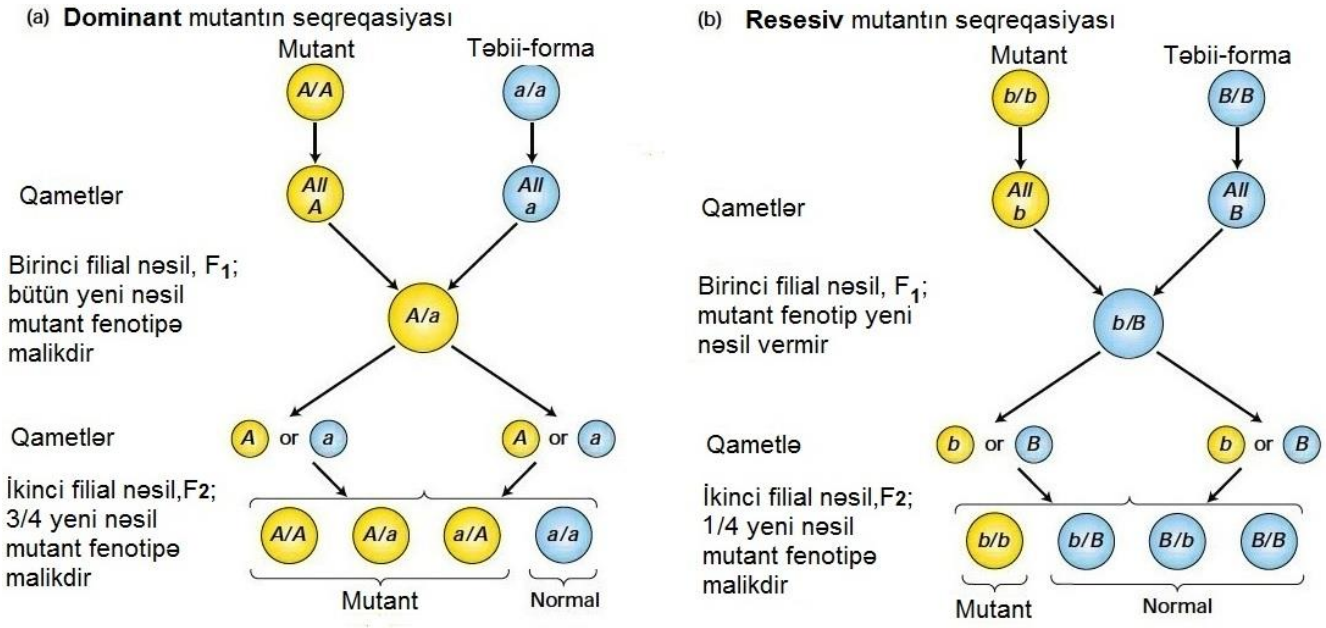
Öncə qeyd olunduğu kimi, mühüm eksperimental orqanizm olan *S. cerevisiae* maya göbələyi həm diploid həm də haploid vəziyyətlərdə ola bilir. Bu birhüceyrəli eukariot orqanizmdə haploid hüceyrələr arasında çarpazlaşma mutant allelin dominant və ya resessiv olmasını təyin edə bilir. Hər bir xromosomdan yalnız bir nüsxəyə malik olan haploid maya hüceyrələri **a** və **α** kimi məlum olan iki müxtəlif cütləşən tipdə ola bilir. Əks cütləşən tipin hapliod hüceyrələri cütləşərək hər xromosomdan iki nüsxəy malik olan a/α diploidləri əmələ gətirirlər. Əgər, haploid ştammda müşahidə olunan fenotipin yeni mutasiyası ayrılarsa, mutant allel üçün heteroziqot olan a/α diploidləri əmələ gətirmək üçün mutant ştamm əks cütləşən tip kimi təbii forma ştammla cütləşə bilər. Əgər bu diploidlər mutant əlaməti göstərirsə onda mutant allel dominantdır, yox, əgər diploidlər təbii formada olurlarsa, onda mutant allel resessiv olur. a/α diploidlər aclıq (qida çatışmazlığı) şəraitinə keçirilərkən hüceyrələr meyoz bölünməyə gedirlər və dörd haploid sporların tetrad-ını, iki tip **a** və iki tip **α** əmələ gətirirlər. Heteroziqot diploid hüceyrələrin sporəməlegətirmə prosesi iki mutatnt allelə malik olan və iki təbii formalı allelə malik olan sporları əmələ gətirir (Şəkil 6-5). Müvafiq şəraitdə, maya sporları cücərəcək, hər iki cütləşmə tipinə aid olan vegetativ haploid ştammları əmələ gətirəcək.

Şərti Mutasiyalar Mayada Əhəmiyyətli Genlərin Öyrənilməsində Istifadə Oluna Bilər.

Mutasiyaların ayrılmasında və öyrənilməsində istifadə olunan əməliyyatlar ***genetik ekranlar*** (***genetic screens***) adlanır və eksperimental orqanizmlərin haploid və ya diploid olmasından asılıdır, əgər bu sonuncudursa, onda mutasiyanın resessiv və ya dominant olmasından da asılıdır. Həyət üçün əhəmiyyətli olan zülalları kodlaşdıran genlər tədqiqat üçün daha maraqlı və mühüm olan genlər sırasındadır. Həyati əhəmiyyətli genlərin mutasiyalarının fenotipik ekspressiyası fərdin ölümünə apardığından, letal mutasiyaya malik olan orqanizmlərin alınması üçün ağıllı genetik ekran lazımdır.



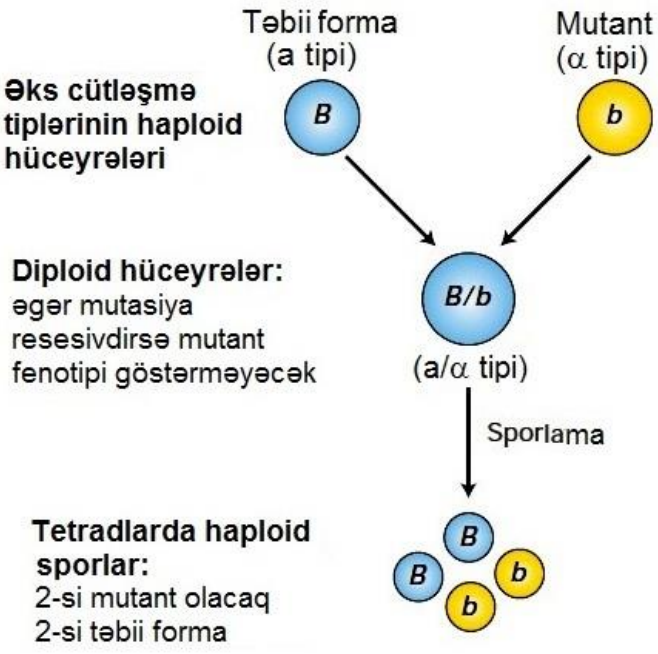
ŞƏKIL 6-3 Mitoz və meyozun müqayisəsi. Həm somatik hüceyrələr həm də premeyoz rüşeym heceyrələri hər cüt xromosomdan birini anadan digərini isə atadan almış iki nüsxəsinə malikdir (2*n*). Hər biri iki qız xromatiddən təşkil olunan, replikasiya olunmuş xromosomlar mitoz zamanı hüceyrə mərkəzində elə düzülürlər ki, hər iki qız hüceyrə xromosomların morfoloji tipinin həm ata həm da ana homoloqunu alırlar. Amma, birinci *meyoz* bölünməsi zamanı hər bir replikasiya olunmuş xromosom hüceyrə mərkəzində öz homoloji partnyoru ilə cütləşir; belə xromosom cütləşməsi ***sinaps*** adlanır və şübhəsiz belə cütləşmə mərhələsində homoloji xromosomlar arasında krossinqover baş verir. Sonra, hər bir morfoloji tipin bir replikasiya olunmuş xromosomu hər bir qız hüceyrəsi daxilinə gedir. Nəticədə əmələ gəlmiş hüceyrələr DNT replikasiyası olunmadan ikinci bölünməyə gedir, hər bir morfoloji tipin bacı xromatidləri mütənasib olaraq yeni qız hüceyrələrinə ayrılırlar. İkinci meyoz bölünmədə xromatidlərin düzülüşü və onların qız hüceyrələrə bərabər seqreqasiyası (ayrılması) mitoz bölünmədə olduğu kimi baş verir. Homoloji xromosom cütlərinin metafaza I-də düzülüşü başqa xromosom cütləri ilə nisbətdə təsadüfi olur, nəticədə hər bir qız hüceyrədə ata və ana mənşəli xromosomların qatışığı alınır.



ŞƏKİL 6-4 Diploid orqanizmlərin təmiz-nəsil ştamları arasında çarpazlaşmada dominant və resessiv mutasiyaların seqreqasiya rofili. Birinci nəsildə (F_1) əmələ gələn bütün törəmələr heteroziqotdurlar. Əgər mutant allel dominantdırsa, F_1 törəmələr (a) hissəsində olduğu kimi mutant fenotipi əmələ gətirəcəklər. Əgər mutant allel resessivdirsə, F_1 törəmələr (b) hissəsində olduğu kimi təbii formanın fenotipini əmələ gətirəcəklər. F_1 heteroziqotların öz aralarında çarpazlaşması da həmçinin F_2 nəsildə dominant və resessiv allellərin fərqli seqreqasiya nisbətini əmələ gətirəcəkdir.

Haploid maya hüceyrələrində əhəmiyyətli genlər ***şərti mutasiyalardan*** istifadə etməklə öyrənilə bilər. Şərti mutasiyalar arasında daha çox yayılanı ***temperatuta-həssas mutasiyadır***, bunu müxtəlif temperatur diapozonunda bitən bakteriyalarda və ibtidai eukariotlarda almaq mümkündür. Məsələn, tək bir missens mutasiya nəticəsində alınan mutant orqanizm zülalda termal stabilliyin azalmasına səbəb olur, belə ki, zülal yalnız bir temperaturda (məsələn 23°C-də) tam fəal olur, amma digər temperaturda (məsələn 36°C-də) denaturasiya olunmağa başlayır və qeyri fəal our, amma normal zülal hər iki temperaturda tam stabil və funksional olur. Mutant fenotipin müşahidə olunduğu temperatur ***yolverilməyən*** (***nonpermissive***) adlandırılır; ***yolverilən*** (***permissive***) temperatur isə o temperaturdur ki, hətta mutant allelin mövcud olduğu halda belə mutant fenotip müşahidə olunmur. Beləliklə mutant ştammlar yolverilən temperaturda mutant fenotiplərin analizi üçün qorunub saxlanıla bilir.

S. cerevisiae maya göbələyində temperatura-həssas mutantların müşahidəsi üçün əhəmiyyətli nümunə L.H. Hartvel və əməkdaşlarının tədqiqatlarından 1960-cı illərin sonu və 1970-ci illərin əvvəlində meydana gəlmişdir. Onlar hüceyrə tsikli zamanı onun tənzimlənməsində iştirak edən əhəmiyyətli genlərin identifikasiyasını müəyyən etməyə başladılar (bu zaman hüceyrə zülalları sintez edir və öz DNT-sini replikasiya edərək mitoz bölünməyə başlayır). Tək bir maya hüceyrəsinin 20-30 hüceyrə bölünməsi nəticəsində eksponensial artması bərk aqar mühitində gözlə görünə bilən maya koloniyasını əmələ gətirir. Mutantlarda hüceyrə tsikli tam kəsildiyindən və onlar koloniya yarada bilmədiyindən, belə əsas hüceyrə proseslərinə təsir edən mutasiyanı öyrənmək üçün şərti mutasiyalardan istifadə olunması tələb olunur. Belə mutantları ekranlaşdırmaq üçün tədqiqatçılar əvvəlcə maya hüceyrələrini mutagenlərin



ŞƏKİL 6-5 Maya göbələyində allellərin ayrılması (seqreqasiyası). Əks cütləşən tipin haploid *Saccharomyces* hüceyrələri (burada, bir cütləşən tip **α** və digər cütləşən tip **a**) cütləşərək **a/α** diploidini əmələ gətirə bilirlər. Əgər bir haploid, dominant təbii-forma-tipli allelə malikdirsə və digəri eyni genin resessiv mutant allelinə malikdisə, nəticədə əmələ gələn heteroziqot diploid dominant əlaməti ekspressiya edəcək. Müəyyən şəraitdə diploid hüceyrələr dörd haploid sporun tetradını əmələ gətirəcək. Tetradda sporlardan ikisi resessiv əlaməti və digər ikisi isə dominant əlaməti ekspressiya edəcəklər.

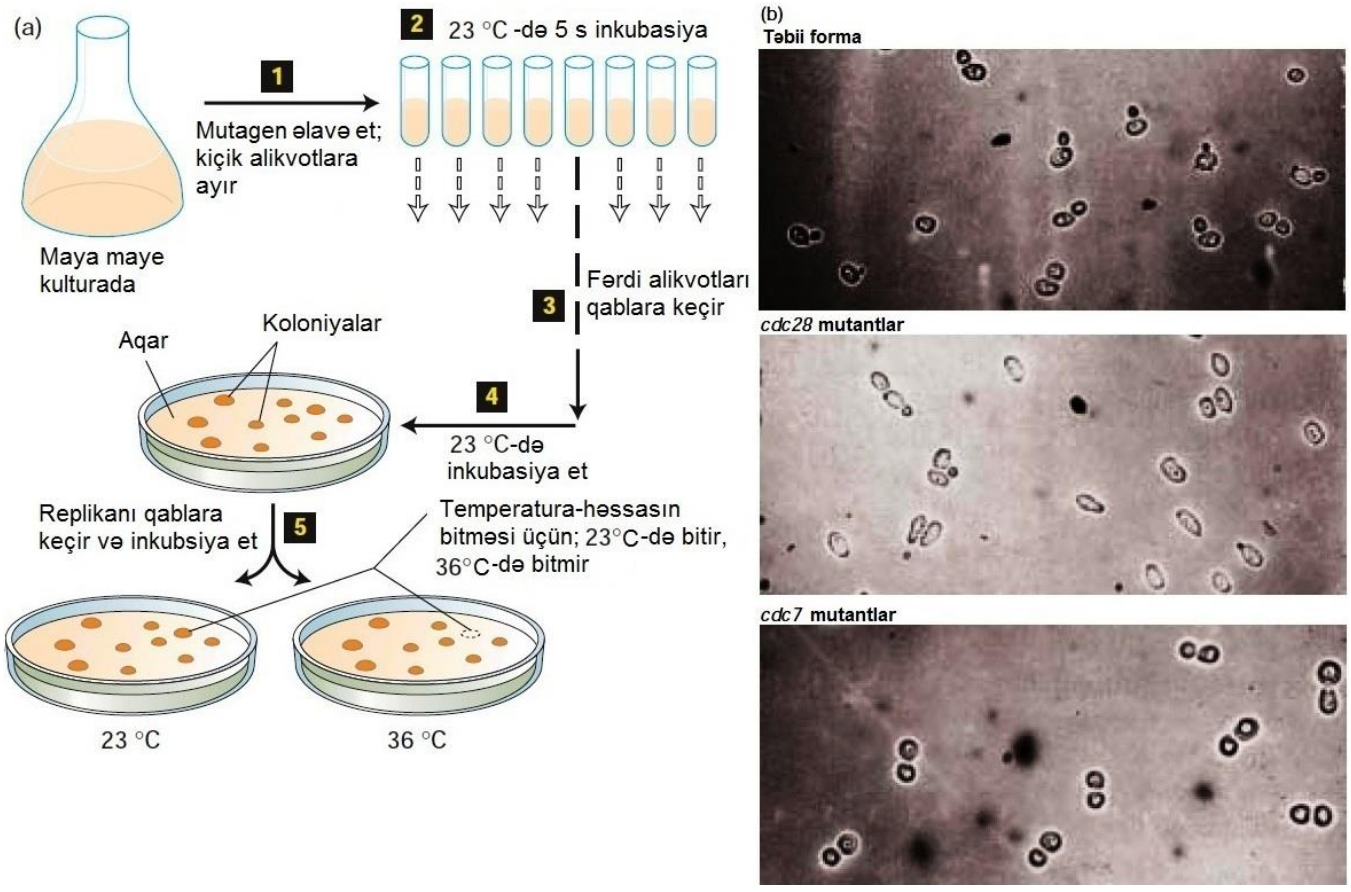
təsirinə məruz qoydular, sonra isə aşkar edilmiş mutant mayanı ayırdılar, belə hüceyrələr 23°C-də normal bitib inkişaf edirlər, amma 36°C şəraitə keçirdikdə inkişaf edib koloniya yarada bilmirlər (Şəkil 6-6a).

Temperatura-həssas mutantlar ayrıldıqdan sonra aparılıan analizlər aşkar etdi ki, doğrudan da onların bəziləri hüceyrə bölünməsində qüsurludu. *S. cerevisiae* hüceyrələrində, hüceyrə bölünməsi tumurcuqlama yolu ilə baş verir və adətən işıq mikroskopu ilə asanlıqla görünə bilən tumurcuqların ölçüsü hüceyrələrin hüceyrə tsiklində vəziyyətini təyin etməyə imkan verir. 36 °C şəraitində bitə bilməyən hər bir mutant, işıq mikroskopu altında, yolverilməyən temperatur şəraitinə keçirildikdən bir neçə saat sonra tədqiq olunmuşdur. Çoxsayı temperatura-həssas mutantların tədqiqi göstərdi ki, hüceyrə tsiklində təxminən 1 faiz mutant müxtəlif formada və dərəcədə blok olunmanı nümayiş etdirirlər. Ona görə də bu mutantlar ***hüceyrə bölünməsi tsikli*** (***cell cycle division − cdc***) mutantları adlandırılmışdır. Əhəmiyyətlisi odur ki, bu maya mutantları, əsas hüceyrə metobalizminə təsir edən mutasiya nəticəsində sadəcə olaraq bitməni itirmir. Əksinə, yolverilməyən temperatur şəraitində, öyrənilən mutantlar hüceyrə tsiklinin müəyyən hissəsinə qədər normal bitirlər, amma sonra, hüceyrə tsiklinin müəyyən hissəsində bitmə arest olunur (dayandırılır), bu mərhəllədə hüceyrələrin əksəriyyəti görünürlər (Şəkil 6-6b). Maya cdc mutasiyaıların əksəriyyəti resessivdir; ona görə də, haploid cdc ştammlar təbii forma haploidlərlə cütləşirlər, nəticədə əmələ gələn heteroziqot diploidlər hüceyrə bölünməsində nə temperatuta həssas olurlar nə də hüceyrə bölünməsi üçün qüsurlu olurlar.

Diploidlərdə Resessiv Letal Mutasiyalar Inbridinq Yolu Ilə Identifikasiya Oluna Bilər və Heteroziqotlarda Qorunub Saxlanıla Bilər

Diploid orqanizmlərdə, resessiv mutasiyalardan alınmış fenotiplər yalnız mutant allellər üçün homoziqot olan fərdlərdə müşahidə oluna bilər. Diploid orqanizmlərdə mutagenez adətən genin bir allelini dəyişdiyindən, heteroziqot mutantlar əmələ gəlir, ona görə genetik ekran mutant allelə görə homoziqot olan nəsli əmələ gətirmək üçün **inbridinq** pillələrini tətbiq etməlidir. Genetik H. Müller, meyvə milçəyi *Drosophila*-da bu cürə inbridinq eksperimentlərini aparmaq üçün ümumi olan əhəmiyyətli bir prosesi inkişaf etdirmişdir. *Drosophila*-da və başqa diploid orqanizmlərdə resessiv letal mutasiya heteroziqot fərdlərdə alına bilər və onların fenotipik nəticələri homoziqotlarda analiz oluna bilər.

Müllerin metodu böyük effektlə C. Nüsslein-Volhard və E. Vieshaus tərəfindən istifadə olundu, onlar mütamadi olaraq *Drosophila*-nın embriogenezinə təsir edən resessiv letal mutasiyanı ekranlaşdırırdılar. Bu metodla identifikasiya olunmuş, resessiv letal mutasiyaya malik olan ölmüş homoziqot embrionlar embrionda xüsusi morfoloji çatışmazlıqları aşkar etmək üçün mikroskop altında tədqiq olundular. Çoxhüceyrəli orqanizmlərin inkişafının molekulyar mexanizmi haqqında müasir anlayışlar, əhəmiyyətli dərəcədə *Drosophila* mutantlarının xüsusiyytlərinin öyrənilməsi ilə həyata keçirilən, rüşeymin inkişafının ətraflı izahına əsaslanmışdır



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-6 Tempratura-həssas letal mutasiyaları daşıyan haploid maya hüceyrələri yolverilən temperaturda əldə oluna, yolverilməyən temperaturda isə analiz oluna bilər. (a) *S. sereviciae*-də temperatura-həssas hüceyrə bölünməsi tsikli (***cdc***) mutantlarının genetik ekranı. 23°C-də (yolverilən temperatur) bitən və koloniya əmələ gətirən, amma 36°C-də (yolverilməyən temeperatur) bitməyən maya hüceyrələrinin bölünməsini blok edən letal mutasiyaya malik ola bilir. Bax L.H. Hartvell, 1967, *J.Bacteriol*. **93**:1662. (b) Temperatura-həssas koloniyalarda hüceyrə tsiklinin xüsusi mərhələsində blok-olunmanın yoxlanılması. Burada göstərilən təbii formalı mayanın və iki müxtəlif temperatura həssas mutantların yolverilməyən temperaturda 6 saat müddətində inkubasiya olunduqdan sonrakı mikrofotosudur. Bitməkdə davam edən və müxtəlif ölçülü tumurcuqlarla birlikdə görünən təbii forma hüceyrələri hüceyrə tsiklinin müxtəlif mərhələlərini əks etdirir. Bunun əksinə, aşağıdakı iki mikrofotodakı hüceyrələr hüceyrə tsiklinin xüsusi mərhələsində blokolunmanı göstərir. ***cdc***28 mutantlar yeni tumurcuqların əmələ gəlmə anında arest olunur, ona görə də tumurcuqsuz hüceyrələr görünür. Ana hüceyrədən ayrıldıqdan dərhal sonra arest olunan ***cdc***7 mutantlar və tumurcuqlar (əmələ gələməkdə olan qız hüceyrələr) böyük tumurcuqlu hüceyrələr kimi meydana gəlir. [(b) hissəsi Elsevier razılığı ilə, Herefor, L. M, and Hartvell, L. H., "Sequential gene function in the initiation of *Saccharomyces cerevisiae* DNA synthesis,*" Journal of Molecular Biology,* 1974, **84**:3, pps 445-456-dən yenidən çap olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc. vasitəsi ilə alınmışdır.]

Komplementasiya Testləri Eyni Gendə Müxtəlif Resessiv Mutasiyaların Olduğunu Təyin Edir

Tədqiqatçılar xüsusi hüceyrə proseslərini öyrənmək üçün tez-tez klassik genetik yanaşmadan istifadə edərək, eyni fenotipi əmələ gətirən çoxsaylı resesiv mutasiyaları ayırırlar. Bu mutasiayların eyni gendəmi və ya ayrı-ayrı genlərdəmi olduğunu yoxlamaq üçün geniş yayılan metod genetik komplementasiya (tamamlama) hadisəsindən istifadə edir, bu təbii forma fenotipinin iki müxtəlif mutantı çarpazlaşdırmaq yolu ilə bərpasıdır. Əgər iki resessiv mutasiya ***a*** və ***b eyni*** gendədirsə, onda bir ***a*** allelini və bir ***b*** allelini daşıyan diploid orqanizm mutant fenotipi göstərəcək, çünki hər iki allel bu genin fəal nüsxəsini təmin edə bilmir. Əksinə, **a** və ***b*** mutasiyaları ***ayrı*** genlərdə olarsa, onda hər bir mutant allelin bir nüsxəsinə malik olan heteroziqotlar mutant fenotipi göstərə bilməyəcək, çünki hər bir genin təbii forma alleli də mövcuddur. Belə olan halda, bunlara bir birinə ***komplemetar*** (tamamlayıcı) olan mutasiya deyilir. Komlementarlıq analizi dominant mutasiyalar üzərində aparıla bilməz, çünki mutant allellə müqayisə olunan fenotip hətta genin təbii-formalı allelinin mövcud olduğu halda belə ortaya çıxır.

Eyni fenotipi nümayiş etdirən mutantlar dəstinin komplementasiya analizləri, fəaliyyətinə görə bir-birinə yaxın olan və verilmiş fenotipik əlaməti əmələ gətirmək üçün fəaliyyət göstərən genlər arasında fərdi genləri ayırd edə bilir. Məsələn, öncə təsvir olunmuş, ***cdc*** mutasiyanın *Saccharomyces* hüceyrələrində aşkarlanması zamanı hüceyrə tsiklinin eyni mərhələsində arest olunmuş bir-çox temperatura-həssas resessiv mutantlar alınmışdır. Bu mutasiyanın nə qədər çox genlərə təsir etdiyini təyin etmək üçün Harvell və əməkdaşları ***cdc*** mutantların bütün cütləşmiş kombinasiyalarının Şəkil 6-7-də göstərilmiş protokol ardıcıllığı üzrə komplementarlıq testini həyata keçirdilər. Bu testlər 20-yə yaxın müxtəlif *CDC* genlərində 100-dən artıq *cdc* mutasiyaları identifikasiya etdi. Fəsil 19-da təsvir edildiyi kimi *CDC* genlərin və onların kodlaşdırdığı zülalların daha sonra davam edən molekulyar tədqiqatları maya göbələyindən başlayaraq insana qədər hüceyrə bölünməsinin necə tənzimləndiyini izah edən bünövrəni təmin etdi.

İkiqat Mutantlar Zülalların Fəaliyyət Göstərmə Ardıcıllığını Qiymətləndirmək Üçün Əhəmiyyətlidir

Müəyyən bir hüceyrə prosesi ilə bağlı olan mutant fenotiplərin ciddi analizinə əsaslanaraq tədqiqatçılar tez-tez genlər dəstinin və onların zülal məhsullarının funksiyalarının ardıcıllığını açırlar. İki əsas tip proses belə analizlər üçün əlverişlidir: (a) ilkin materialın bir və ya daha artıq aralıq materiallar vasitəsilə son məhsula çevridiyi biosintez yolları; (b) başqa prosesləri tənzimləyən və kimyəvi aralıq məhsullardan daha çox informasiya axınına daxil olan siqnal yolları.

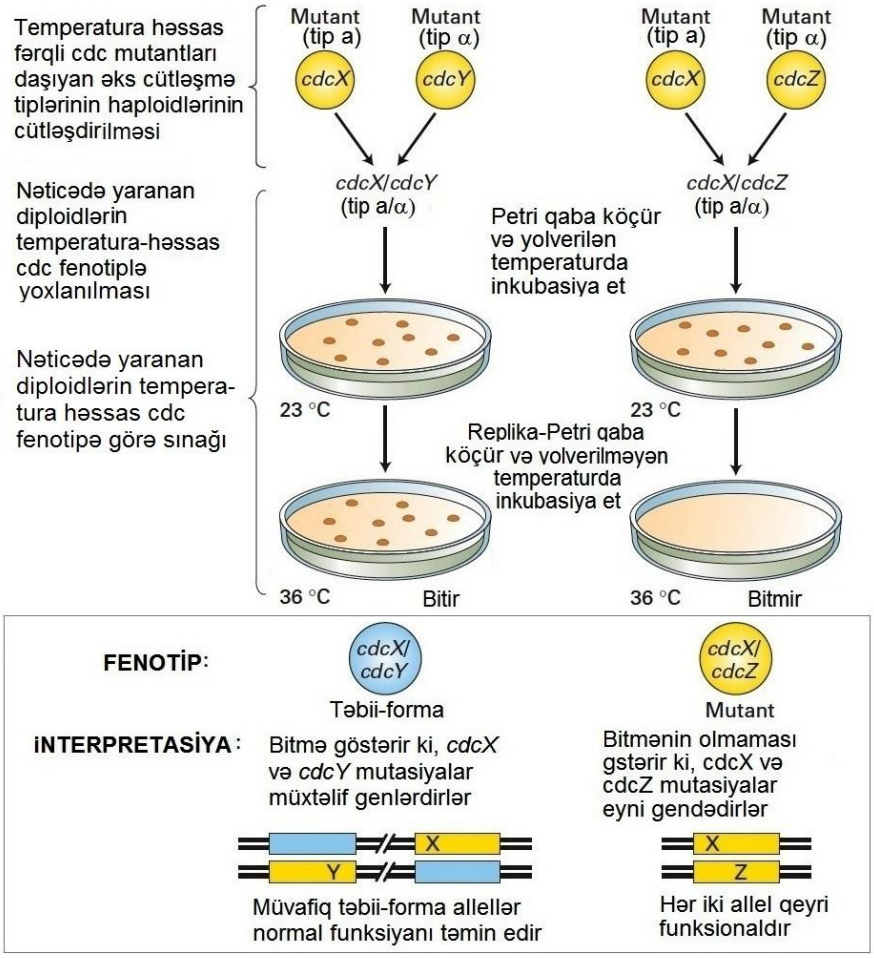
Biosintetik Yolların Ardıcıllığı Birinci tip proses üçün sadə misal olaraq bakteriyada triptofan amin tirşusu kimi metabolitin biosintezini göstərmək olar. Bu halda, triptofanın sintezi üçün tələb olunan fermentlərin hər biri bu yolda aralıq məhsulların birinin növbəti məhsula çevrilməsini kataliz edir. *E. coli*-də bu fermentləri kodlaşdıran genlər genomda bir yerdə bir-birinin ardınca çox yaxın (bitişik) yerləşərək ***trip*** operonunu təşkil edirlər (bax Şəkil 5-13). Bu fermentlər üçün müxtəlif genlərin təsir etmə ardıcıllığı və uyğun olaraq metabolik yolda biokimyəvi reaksiyaların ardıcıllığı ilkin olaraq, hər bir mutantda toplanıb qalmış aralıq birləşmələrin tiplərinə əsasən müəyyən edilmişdir. Amma, kompleks sinteik yol olan halda, bir mərhələdə qüsurlu olan mutantların fenotipik analizləri aydın olmayan nəticələrə gətirib çıxara bilər, bu da sintez yolunda mərhələlərin ardıcıllığı üzrə düzgün olmayan nəticə çıxarılmasına səbəb olur. Meatbolik yolun iki mərhələsində qüsurlu olan ikiqat mutantlar belə metabolik yolların ardıcıllığının öyrənilməsi üçün daha əhəmiyyətlidir (Şəkil 6-8a).

Fəsil 14-də, biz ifrazat yollarını izah etmək üçün ikiqat mutant strategiyasının klassik istifadəsini müzakirə edirik. Bu yolda, hüceyrədən kənara ifraz olunan zülallar qırışlı endoplazmatik şəbəkədə (ER) sintez olunduqları mərkəzdən çıxaraq Qolci kompleksinə, sonra ifrazat qovucuqlarına keçərək, sonda hüceyrə səthinə çıxırlar.

Siqnal Yollarının Təşkili Sonrakı fəsillərdə öyrənəcəyimiz kimi, çox eukariot genlərin ekspressiyası, hüceyrəxarici hormonlar, boy faktorları və ya başqa siqnallar vasitəsi ilə inisiasiya olunan siqnal yolları ilə tənzimlənir. Bu cürə siqnal yollarına çoxsaylı komponentlər daxil ola bilir, ona görə də ikiqat-mutantların analizi çox hallarda bu komponentlərin funksiyası və qarşılıqlı əlaqələri istiqamətində yeni biliklərin yaranmasına səbəb olur. Bu cürə analizlərdən səmərəli informasiyanı almaq üçün yeganə tələb olunan şərt odur ki, iki mutasiya reporter genin eksressiyası ilə ölçüldüyü kimi, eyni tənzimlənən yolun gedişinə çox fərqli, hətta əks təsirə malik olmalıdırlar. Daha çox hallarda, bir mutasiya, hətta siqnal mövcud old olsa da belə xüsusi reportyor genin ekspressiyasını dayandırır (repressiya edir), amma digər bir mutasiya hətta siqnalın olmadığı halda belə reportyor genin ekspressiyasına

səbəb olur (məsələn, konstitutiv ekspressiya). Şəkil 6-8b-də göstərildiyi kimi, iki sadə tənzimləyici mexanizm bu cürə tək mutantlarla uzlaşır, amma ikiqat-mutant fenotiplər onları fərqləndirə bilir. Belə əsas yanaşma genetiklərə imkan verdi ki, müxtəlif fərqli tənzimləyici yollarda çoxsaylı əsas mərhələləri təsvir etsinlər, daha spesifik biokimyəvi analizlər üçün şərait yaratsınlar.

Qeyd etmək lazımdır ki, bu metodlar yenicə müzakirə olunmuş komplementasiya analizlərindən onunla fərqlənir ki, burada həm dominant həm də resessiv mutantlar ikiqat-mutant analizləri üçün istifadə oluna bilər. İki resessiv mutasiya sınaqdan keçirilərkən yaradılmış ikiqat mutant hər iki mutasiya üçün ***homoziqot*** olmalıdır.



EKSPERIMENTAL ŞƏKIL 6-7
Komplementarlıq analizi resesiv mutasiyanın eyni gendə və ya fərqli genlərdə olduğunu təyin edir. Maya göbələyində komplementarlıq sınağı, diploid hüceyrələri əmələ gətirmək üçün müxtəlif resessiv mutasiyalara malik olan haploid **a** və **α** hüceyrələrin cütləşməsi ilə aparılmışdır. *cdc* mutasiyaların analizi zamanı haploid temperatur-həssas *cdc* ştammların müxtəlif cütləri müntəzəm olaraq sistemli şəkildə cütləşdirilmiş, nəticədə əmələ gəlmiş diploidlər yolverilən və yolverilməyən temperaturlarda bitirməklə sınaqdan keçirilmişdir. Bu cürə ehtimal olunan nümunədə, *cdcX* və *cdcY* mutantlar bir-birinə komplementar olurlar və müxtəlif genlərdə mutasiyaya malik olurlar, amma *cdcX* və *cdcZ* mutantlar eyni gendə olan mutasiyalara malikdirlər.

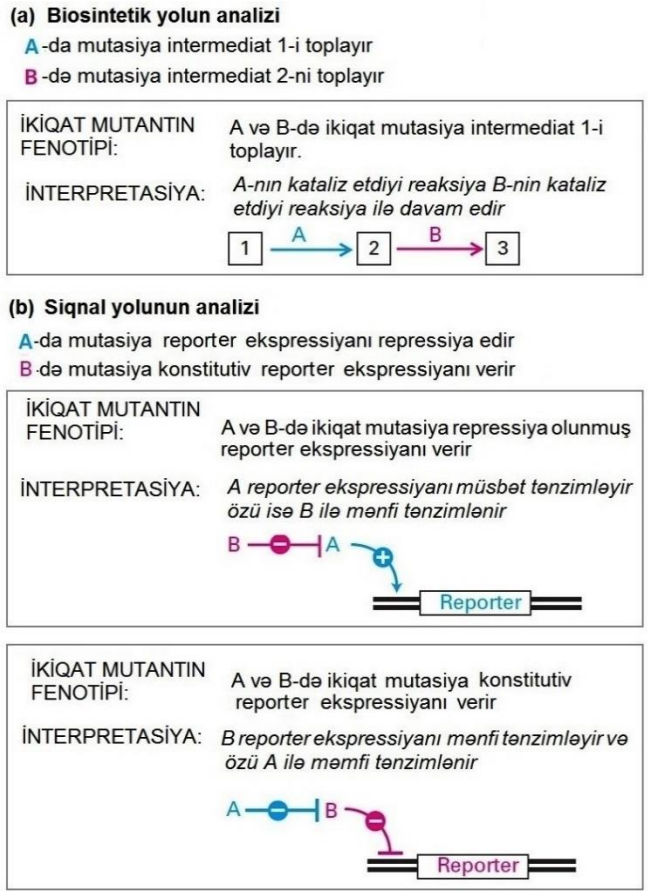
Genetik Supressiya və Sintetik Letallıq Qarşılıqlı Təsirdə Olan və ya Artıqlıq Edən Zülalları Aşkar Edə Bilir

Genetik analizlərin başqa iki tipi, eyni hüceyrə proseslərində fəaliyyət göstərən zülalların canlı hüceyrədə bir biri ilə necə qarşılıqlı təsirdə olmaları barədə əlavə dəlilləri təmin edir. Çoxsaylı muxtəlif eksperimental orqanizmlərdə tətbiq olunan bu metodların hər ikisində ikiqat mutantlardan istifadə edilir, belə ki, bir mutasiyanın yaratdığı fenotipik təsir ikinci mutasiyanın təsiri ilə dəyişilir.

Supressor Mutasiya Birinci tip analizlər ***genetik supressiyaya*** əsaslanmışdır. Bu hadisəni anlamaq üçün, zənn edək ki, nöqtəvi mutasiya bir zülalda (A) quruluş dəyişikliyinə səbəb olur və onun assosasiyada olduğu, eyni hüceyrə prosesində fəaliyyət göstərən başqa bir zülalla (B) qarşılıqlı təsirdə olma qabliyyətini qırır. Eynilə, B zülalında olan mutasiya onun A zülalı ilə qarşılıqlı təsirdə olma qabliyyətini ingibirləşdirən kiçik quruluş dəyişikliyinə səbəb olur. Bundan başqa, hesab edək ki, A və B zülallarının normal fəaliyyəti onların qarşılıqlı təsirində olmalarından asılıdır. Nəzəri olaraq, A zülalında xüsusi quruluş dəyişikliyi B zülalındakı kompensasiya dəyişikliyi ilə supressiya oluna bilər və mutant zülallara qarşılıqlı təsirdə olmaq imkan yaradar. Bu cürə supressor mutasiyanın baş verdiyi nadir hallarda, hər iki mutant allelə malik olan ştamm normal olmalıdır, amma yalnız bir mutasiyanı və ya başqa mutant alleli daşıyan ştamm mutant fenotipi yaradacaq (Şəkil 6-9a).

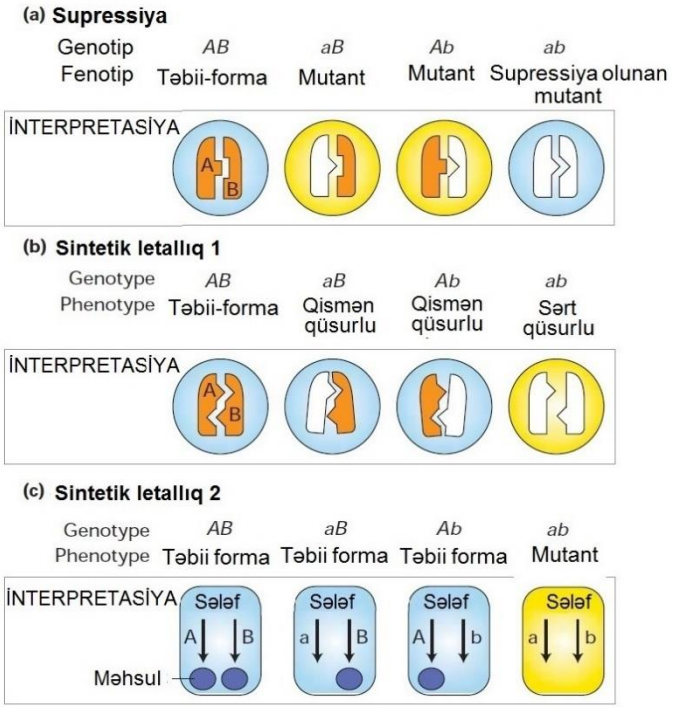
Mutant aktin allelini (*act1-1*) və başqa bir gendə ikinci mutasiyanı (*sac6*) daşıyan maya ştammlarında genetik supressiyanın müşahidəsi iki gen tərəfindən kodlaşdırılan zülallar arasında *in vivo* birbaşa qarşılıqlı əlaqənin olduğunu sübut edən ilkin dəlilləri ortaya qoydu. Sonra biokimyəvi

tədqiqatlar göstərdi ki, bu ki zülal — Act1 və Sac6 — həqiqətən də hüceyrə daxilində funksional aktin quruluşu yaratmaq üçün qarşılıqlı təsirdə olurlar.



ŞƏKİL 6-8 İkiqat mutantların analizi çox hallarda biosintetik və ya siqnall yollarının mərhələlərini təşkil edə bilir. İki müxtəlif gendə aparılmış mutasiya eyni hüceyrə proseslərinə təsir edərkən, amma tamamilə fərqli fenotiplərə malik olarkən, ikiqat mutantın fenotipi çox hallarda bu iki genin funksiyalarının ardıcıllığını aşkar edə bilir. (a) Eyni biosintetik yola təsir edən mutasiyalar olan halda, ikiqat mutant əvvəllər təbii-forma orqanizmdə fəaliyyət göstərən zülalın kataliz etdiyi mərhəlni keçdikdən dərhal sonra, aralıq məhsulları toplayacaq. (b) Siqnal yolunun ikiqat-mutant analizi o zaman mümkündür ki, iki mutasiya reportyor genin ekspressiyasında əks təsirə malik olsunlar. Bu halda, ikiqat mutantın müşahidə olunan fenotipi, zülalların təsir etmə ardıcıllığı barədə və onların mənfi və ya müsbət tənzimləyici olmaları barədə məlumatı təmin edir.

Sintetik Letal Mutasiyalar *Sintetik letallıq* adlandırılan başqa bir hadisə, suppressiyanın əksinə olan fenotipik effekti yaradır. Bu halda, bir mutasiyanın zərərli təsiri buna yaxın olan ikinci genin mutasiyası ilə (supressiya edilməkdənsə) daha yüksək dərəcədə gücləndirilir. Bu cürə sintetik letal mutasiyanın əmələ gəldiyi bir vəziyyət Şəkil 6-9b-də göstərilmişdir. Bu nümunədə, heterodimer zülal onun qeyri identik subvahidlərindən hər hansı birində mutasiya olunmaqla tam deyil, yalnız qismən fəalsızlaşdırılmışdır. Amma, hər iki subvahidi kodlaşdıran genlərdə xüsusi mutasiyaları daşıyan ikiqat mutantlarda subvahidlər arasında əmələ gələn cüzi qarşılıqlı təsir kəskin fenotipik effektlərin yaranmaslna səbəb olur. Sintetik letal mutasiyalar, əhəmiyyətli hüceyrə komponentlərini istehsal edmək üçün lazımsız metabolik yollarda (redundant pathways) fəaliyyət göstərən zülalları kodlaşdıran az əhəmiyyətli genləri də aşkar edə bilər. Şəkil 6-9c-də təsvir edildiyi kimi, əgər bu metabolik yollardan biri tək fəalsızlaşdırılarsa o biri yol lazım olan məhsulu təmin etməyə qabil olacaq. Amma, əgər hər iki yol eyni vaxtda fəalsızlaşarsa, o zaman vacib olan məhsullar sintez oluna bilmir və ikiqat mutant həyatı qabliyyətə malik olmayacaq.



ŞƏKİL 6-9 Genetik supressiya və ya sintetik letallığa səbəb olan mutasiya qarşılıqlı təsirdə olan və ya lazımsız artıq olan zülalları aşkar edir. (a) Müşahidə zamanı, iki müxtəlif qüsurlu zülala (A) və (B)-yə malik olan ikiqat mutantlar təbii forma fenotipinə malik olduğu halda tək bir mutasiya mutant fenotipi yaradır, bu göstərir ki, hər bir zülalın funksiyası digər zülal ilə qarşılıqlı təsirdən asılıdır. (b) İkiqat mutantların tək mutantlardan daha sərt fenotipik qüsura malik olması müşahidələri həmçinin təsdiq edir ki, iki zülal (məsələn heterodimerin subvahidləri) normal fəaliyyət üçün qarşılıqlı təsirdə olmalıdırlar. (c) İkiqat mutantın həyat qabliyyətinə malik olmaması, amma müvafiq tək mutantların təbii forma fenotipinə malik olması müşahidələri göstərir ki, iki zülal mühüm məhsulların istehsalı üçün lazımsız artıq metabolik yollarda (redundant pathways) fəaliyyət göstərirlər.

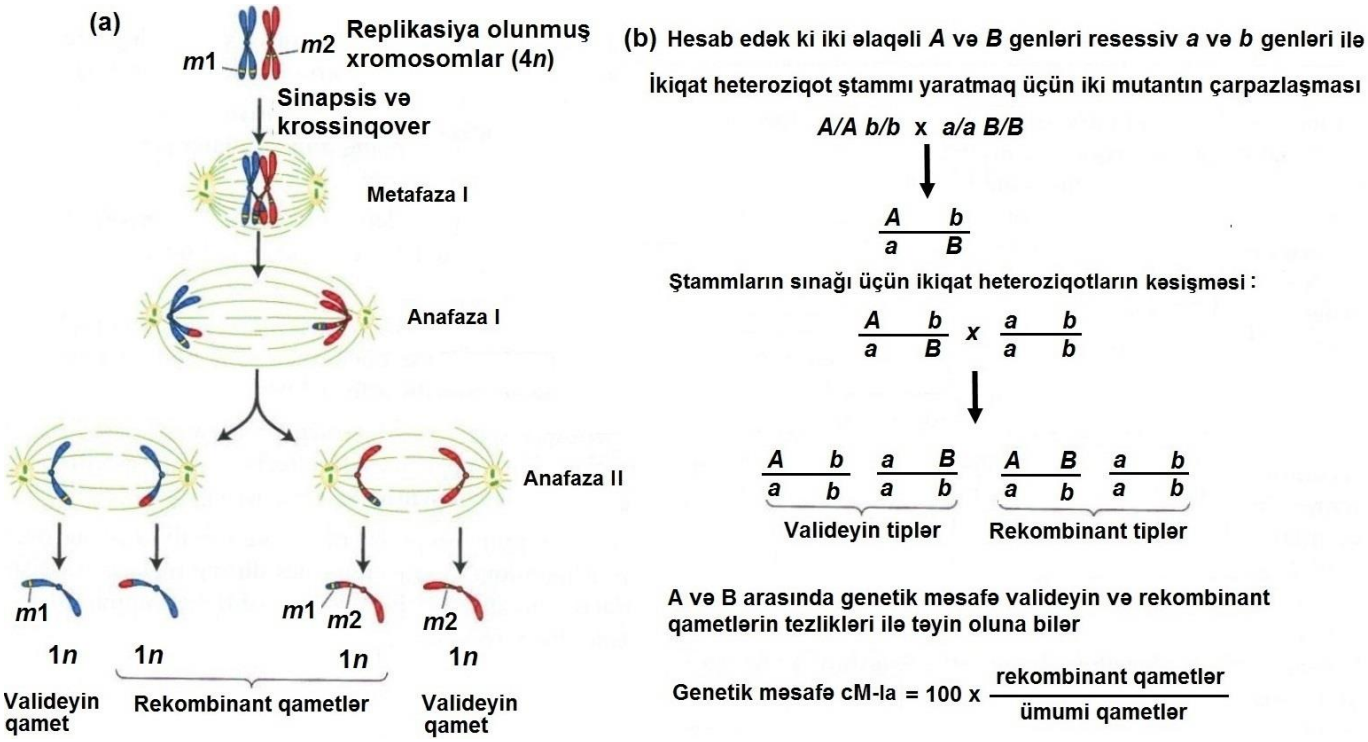
Genlər Onların Xromosomdakı Xəritələnmiş Mövqeyinə Görə Identifikasiya Oluna Bilərlər

Biz indi, ***genin yerləşmə mövqeyinə*** əsaslanan, tamamilə başqa tip genetik analizlərə baxacağıq. Xromosomda genlərin yerləşmə mövqeyini təyin etmək üçün tərtib olunmuş tədqiqatlar, çox hallarda ***genetik xəritələşdirmə tədqiqatları*** adlandırılır və xüsusi mutasiyalarla təsir olunmuş genin

identifikasiyasında istifadə oluna bilər və ya mutasiyaların eyni gendə olub olmadıqlarını təyin etmək olar.

Çox orqanizmlərdə, genetik xəritələşdirmə tədqiqatları genetik informasiyanın mübadiləsinə əsaslanır ki, bu da adətən meyoz zamanı baş verir. Şəkil 6-10a-da göstərildiyi kimi, genetik rekombinasiya rüşeym hüceyrələrində, hər bir homoloji cütün xromosomları replikasiya olunan zaman, amma birinci meyoz hüceyrə bölünməsindən öncə baş verir. Bu zaman, anadan və atadan gəlmiş valideyin xromatidlərdəki homoloji DNT ardıcıllıqları bir-biri ilə dəyişilə bilir və bu proses **krossinqover** adlanır. İndi biz bilirik ki, homoloji xromosomlar arasında əmələ gəlmiş krossoverlər, birinci meyoz hüceyrə bölünməsi zamanı homoloji xromatid cütlərin düzgün seqreqasiyası (ayrılması) və əks qütüblərə çəkilməsi üçün əhəmiyyətli olan quruluş əlaqələrini təmin edir (müzakirəsi Fəsil 19-da verilmişdir).

Hesab edək ki, fərddə iki müxtəlif mutasiyanın hər biri bir valideyindən qazanılmışdır və eyni xromosomda bir-birinə çox yaxın yerləşmişlər. Bu fərd meyoz zamanı krossoverin mutasiyaların arasında baş verməsindən asılı olaraq iki müxtəlif tip qamet yarada bilər. Əgər mutasiyalar arasında krossover baş vermirsə, onda, yalnız bu və başqa bir mutasiyaya malik olan *valideyin tipli* qametlər yaranacaq. Əksinə, əgər krossover iki mutasiya arasında baş verərsə o zaman *rekombinant tipli* qametlər yaranacaq. Bu nümunədə rekombinant xromosomlar ya hər iki mutasiyaya malik olacaq ya da onların heç birinə malik olmayacaq. Rekombinasiya hadisələri xromosomların uzunluğu boyunca az və ya çox dərəcədə təsadüfi olaraq baş verir, beləliklə, iki gen bir-birinə nə qədər yaxın olarsa meyoz zamanı onlar arasında rekombinasiyanın baş baş vermə ehtimalı aşağı olur. Başqa sözlə, *eyni xromosomda yerləşən iki gen arasında rekombinasiya nə qədər az tezlikdə baş verirsə o genlər xromosomda bir-birinə bir o qədər yaxın yerləşirlər*. Eyni xromosomda olan və bir-birinə kifayət qədər yaxın yerləşən iki gen valideyin qametlərə nisbətən çox az miqdarda yeni rekombinant qametlər yaradacaqlar və hesab olunur ki, bunlar bir-biri ilə olan *genetik əlaqəni* nümayiş etdirirlər. Əgər istehsal olunan rekombinant qametlərin sayı valideyin qametlərin sayından əhəmiyyətli dərəcədə az deyilsə, o zaman nəzərdə tutulan iki lokus bir-biri ilə *əlaqəli hesab olunmur* və eyni xromosomda uzaq məsafədə yerləşirlər və ya fərqli xromosomlarda olurlar.



ŞƏKİL 6-10 Meyoz zamanı rekombinasiya genlərin yerləşməsini xəritələşdirmək üçün istifadə oluna bilər. (a) Hesab edək ki, fərdin istehsal etdiyi, *m*1 (sarı) ilə və *m*2 (yaşıl) ilə işarələnmiş iki mutasiyanı daşıyan qametləri uyğun olaraq eyni xromosomun ana və ata versiyasımda yerləşmişdirlər. Əgər birinci meyoz bölünmədən öncə *m*1 və *m*2 arasındakı intervalda krossinqover baş verərsə iki tip rekombinant qamet əmələ gəlir: onlardan biri hər iki mutasiyanı - *m*1 və *m*2 – daşıdığı halda, digəri heç bir muutasiyanı daşımır. Xromatiddə iki mutasiya arasındakı məsafə nə qədər uzun olarsa, onlar daha böyük ehtimalla rekombinasiya ilə ayrılırlar və daha böyük ehtimalla çox rekombinant qametləri yaradırlar. (b) Sadə xəritələşdirmə ekspermentlərində iki müxtəlif genə görə heteroziqot olan ştamm konstruksiya edilmişdir. Bu ştammın istehsal etdiyi valideyin və ya rekombinant qametlərin tezliyi (təkrarı) bu nəslin homoziqot resessiv ştammla sınaq çarpazlaşdırmasından alınan yeni nəsilin fenotiplərində müəyyən oluna bilər. Sentimorqanla (cM) verilən genetik xəritə məsafəsi rekombinant qametlərin faizi ilə göstərilir.

Rekombinasiya xəritələşdirmə metodu 1911-ciildə A. Sturtevant tərəfindən, Kolumbiya Universitetində tələbə kimi T.H. Morqanın laboratoriyasında işlədiyi vaxt yaradılmışdır. İlk dəfə *Drosophila* üzərində işləyərkən istifadə etdiyi bu metod bu vaxta qədər, çoxsaylı müxtəlif eksperimental orqanizmlərdə eyni xromosomda olan iki genetrik lokus arasındakı məsafənin təyini zamanı tətbiq olunur. İki genetik vəziyyət arasında xəritə məsafəsini təyin etmək üçün dizayn olunmuş tipik eksperiment iki pillədən ibarətdir. Birinci pillədə, iki vəziyyətin hər birində və ya *lokusda* müxtəlif mutasiyalara malik olan ştamm yaradılır. İkinci pillədə, bu ştammın yeni nəsili, valideyin və ya rekombinant tipli irsiyyətin nisbi tezliyinin təyini üçün istifadə olunur. İki gen arasında rekombinasiya tezliyinin təyin olunmasının tipik yolu bu heteroziqot yeni nəsildən birini hər bir gen üçün homoziqot olan digər fərdlə çarpazlaşdırmaqdr. Bu cürə çarpazlaşdırma üçün rekombinant nəslin nisbəti asanlıqla təyin edilir, çünki rekombinant fenotiplər valideyin fenotiplərdən fərqlənəcəklər. Konvensiyaya görə, bir ***genetik xəritə vahidi*** kimi, 100 ümumi nəsil daxilində bir rekombinant fərdin yaranması ilə nəticələnən xromosom boyu iki mövqe arasındakı məsafə götürülür. Bu 1 faiz rekombinasiya tezliyinə uyğun gələn məsafə, A. Sturtevantın rəhbəri Morqanın şərəfinə ***sentimorqan*** (**cM**) adlandırılmışdır (Şəkil 6-10b).

Genetik xəritələşdirmə eksperimentlərinin metodlarının tam müzakirəsi bu ilkin tanışlıq müzakirəsinin əhatə dairəsindən kənara çıxır, amma rekombinasiya xəritələşdirməsinin iki xüsusiyyətinin vurğulanması xüsusən lazımdır. Birincisi, iki lokus arasındakı genetik mübadilənin tezliyi onları yalnız bir-birinə yaxın olan lokuslar üçün ayıran əsas cütləri ilə ölçülən fiziki məsafəyə mütənasibdir (demək nolar ki, 10 cM-dən az). Bundan daha uzaqda olan əlaqəli lokus üçün genetik mübadilənin tezliyi ilə ölçülən məsafə, bu intervalda iki və daha artıq krossoverin baş vermə ehtimalına görə, fiziki məsafəni qiymətləndirməməyə meyillidir.

Müxtəlif tip orqanizmlərdə genetik xəritələşdirmə eksperimentlərinin interpretasiyası üçün lazım olan ikinci mühüm konsepsiya odur ki, müxtəlif orqanizmlər üçün genetik məsafə eyni yolla təyin edilsə də, rekombinasiya tezliyi (məsələn, genetik xəritə məsafəsi) ilə fiziki məsafə arasındakı qarşılıqlı nisbət orqanizmlər arasında fərqli olur. Məsələn, 1 faiz rekombinasiya tezliyi (belə ki, 1 cM genetik məsafə) 2.8 k.ə. (kilobasees) ölçüdə fiziki məsafəni maya göbələyində təşkil edir, bu müqayisədə *Drosophila*-da 400 k.ə. və insanda 780 k.ə. olmaqla daha yüksəkdir.

Genetik xəritələşdirmə tədqiqatlarının əsas aparıcı tətbiqlərindən biri maraq mutasiyasının təsir etdiyi genin yerinin tapılmasıdır. Artıq xromosom boyu paylanan çoxsaylı müxtəlif xəritələnmiş əlamətlərin və ya genetik markerlərin yaradılması, xəritələnməmiş mutasiyaların yerini onların meyoz zamanı seqreqasiyasını bu markerlərə görə qiymətləndirməklə təyin etməyə imkan verir. Beləliklə, daha çox müxtəlif markerlər əldə olunduqca mutasiyaların xəritələşdirilməsi daha dəqiqliklə aparıla bilər. 6.4 bölməsində, biz belə metodlardan istifadə etməklə insanın irsi xəstəlikləri zamanı təsir olunan genlərinin necə öyrənildiyini grəcəyik. Xəritələşdirmə eksperimetlərinin ikinci əsas istifadə yeri iki müxtəlif mutasiyanın eyni gendə olub olmadığını təyin etməkdir. Əgər iki mutasiya eyni gendədirsə onlar xəritələşdirmə eksperimentlərində **sıx əlaqədə** olacaqlar, yox, əgər müxtəlif genlərdədirlərsə onlar əlaqədə olmayacaqlar və ya həddən zəif əlaqəli olacaqlar.

6.1 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSIYALARI

Genlərin İdentifikasiyası və Öyrənilməsi Üçün Mutasiyaların Genetik Analizi

- Diploid orqanizmlər hər bir genin iki nüsxəsinə (allellər) malikdir, amma haploid orqanizmlər yalnız bir nüsxəyə malikdir.
- Resessiv mutasiya çox hallarda funksiyanın itməsinə səbəb olur, amma, əgər genin təbii-formalı alleli mövcuddursa o zaman gizli qalır. Mutant fenotipin yaranması üçün hər iki allelin mutasiya olunması vacibdir.
- Dominant mutasiya təbii-formalı allelli gen olan halda da mutant fenotipin yaranmasına səbəb olur. Dominant mutasiya ilə bağlı olan fenotiplər bir qayda olaraq funksiyanın-qazanılması şəklində baş verir.
- Meyoz zamanı diploid hüceyrələr bir DNT replikasiyasına və iki hüceyrə bölünməsinə məruz qalır, nəticədə əmələ gələn dörd haploid hüceyrədə ana və ata xromosomlar və onlarla assosasiyada olan allellər təsadüfi ayrılırlar (bax Şəkil 6-3).
- Genetik çarpazlaşma zamanı dominant və resessiv mutasiyalar xarakterik seqreqasiya (ayrılma) profilini nümayiş etdirirlər (bax Şəkil 6-4).
- Haploid mayada, temperatura-həssas mutasiyalar həyati əhəmiyyətə malik olan genlərin identifikasiyasında və öyrənilməsində xüsusən əhəmiyyətlidir.
- Eyni prosesdə funksiyasına görə yaxın olan genlərin sayı komplementarlıq analizləri ilə təyin oluna bilər (bax Şəkil 6-7).
- Biosintetik yolda və ya siqnal yolunda fəaliyyət göstərən genlərin işləmə ardıcıllığı, təsir prosesində iki pillədə qüsurlu ikiqat mutantların fenotipindən istifadə etməklə müəyyən oluna bilər.
- Zülallar arasın funksiyasına görə əhəmiyyətli qarşılıqlı təsir, allel-spesifik supressor mutasiyaların və ya sintetik letal mutasiyaların fenotipik təsirindən aşkar oluna bilər.
- Eyni xromosomda iki müxtəlif mutasiya arasında genetik məsafəni ölçmək üçün genetik xəritələşdirmə eksperimentlərində meyozun gedişi zamanı homoloji xromosomlar arasında krossinqoverdən istifadə edilir.

6.2 DNT-nin klonlaşdırılması və xəritələşdirilməsi

Genin quruluşunun və funksiyasının təfsilatı ilə molekulyar səviyyədə öyrənilməsi fərdi genin böyük miqdarda təmizlənmiş formada alınmasını tələb eir. Çox hallarda ***rekombinant DNT texnologiyası*** kimi tanınan müxtəlif metodlar **DNT-nin klonlaşdırılmasında** istifadə olunur, bu da, tədqiqatçılara eyni DNT molekullarını böyük miqdarda hazırlamağa imkan verir. **Rekombinant DNT** istənilən sadə DNT molekulu olub, müxtəlif mənbələrdən alınmış ardıcıllıqdan təşkil olunmuşdur.

Maraq DNT fraqmentini klonlaşdırmağın açarı onu sahib orqanizmdə replikasiya edə bilən vektor DNT molekuluna birləşdirməkdir. Vektor və ona daxil edilmiş DNT fraqmentindən təşkil olunmuş vahid rekombinant DNT molekulu sahib hüceyrəyə keçirildikdən sonra, daxil edilmiş DNT vektorla birlikdə replikasiya edir və böyük miqdarda eyni

DNT molekulunu yaradır. Bu sadə sxem aşağıdakı kimi ümumiləşdirilə bilər:

Vektor + DNT fraqmenti

↓

Rekombinant DNT

↓

Sahib hüceyrə daxilində DNT-nin replikasiyası

↓

DNT fraqmentinin ayrılıb təmizlənməsi, ardıcıllığlnın oxunması və manipulyasiyası

Baxmayaraq ki, tədqiqatçılar müxtəılif eksperimental variasiyaları fikirlaşib yaradıblar, verilmiş bu diaqram DNT klonlaşdırılmasında mühüm pilləları göstərir.

Bu bölmədə, biz ilkin olaraq DNT-nin xüsusi ardıcıllıqlarının başqa DNT ardıcıllıqları "dənizindən" ayrılması metodlarını təsvir edəcəyik. Çox hallarda bu proses genomun fraqmentlərə bölünməsini tələb edir, sonra hər bir fraqmentin vektora elə yerləşdirilməsini tələb edir ki, alınan kolleksiya ayrı sahib orqanizmdə rekombinant molekul kimi artırıla (çoxaldıla) bilsin. Çox sayda müxtəlif vektorlar mövcud olduğu halda, bizim müzakirələrimiz əsasən geniş istfadə olunan *E. coli* sahib hüceyrədə plazmid vektorlar üzərində cəmlənəcək. DNT kitabxanası kimi tanınan, bu cürə DNT fraqmentlərinin kolleksiyası daxilində maraq ardıcıllığını təyin etmək üçün müxtəlif metodlardan istifadə oluna biliər. Spesifik DNT fraqmenti ayrıldıqdan sonra, onin dəqiq nukleotid ardıcıllığı alına bilir. Biz bu bölməni polimeraza zəncirvari reaksiyanın (PZR) müzakirəsi ilə qurtarırıq. Bu, çox güclü və çoxtərəfli metod, böyük miqdarda xüsusi DNT ardıcıllıqlarını yaratmaq üçün və digər tərəfdən, laboratoriyada DNT manipulyasiyalarında müxtəlif istiqamətlərdə istifadə oluna bilər. DNT fraqmentlərinin klonlaşdırılmasının müxtəlif tətbiq və istifadə sahələri sonrakı bölmələrdə də müzakirə olunur.

Restriksiya Fermentləri və DNT Liqazalar DNT Fraqmentlərinin Klonlaşdırma Vektorlarına Keçirilməsinə İmkan Yaradır

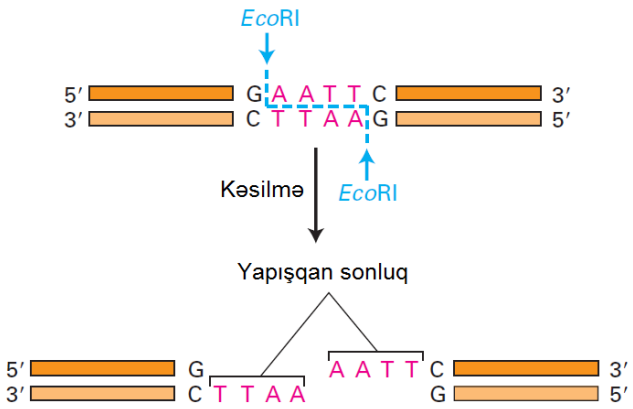
DNT klonlaşdırmasının əsas məqsədi, orqanizmin DNT-sinin spesifik genləri təşkil edəni kiçik diskret rayonlarını əldə etməkdir. Bundan əlavə, yalnız nisbətən kiçik DNT molekulları istənilən mövcud olan vektorlara daxil edilə bilər. Bu məqsədlə, orqanizmin genomunu təşkil edən çox uzun DNT molekulları fraqmentlərə doğranmalıdır ki, onlar vektor DNT-lərə keçirilə bilsinlər. İki tip ferment – **restriksiya fermentləri** və **DNT liqazalar** – bu cürə rekombinant DNT nolekullarının istehsalına (düzəldilməsinə) imkan yaradır.

DNT Molekullarının Kiçik Fraqmentlərə Kəsilməsi

Restriksiya fermentləri bakterialarla istehsal olunan endonukleazalar olub, adətən 4-dən 8-ə qədər nukleotid uzunluqda, ***restriksiya saytı*** adlandırılan xüsusi ardıcıllığı tanıyır və bu saytda hər iki DNT zəncirini kəsir. Restriksiya saytları, bir qayda olaraq qısa ***palindrom*** ardıcıllıqdan ibarətdir, ona görə də DNT-nin hər iki zəncirində 5′-dən 3′-ə doğru oxuduqda restriksiya saytının nukleotid ardıcıllığı eyni olur (Şəkil 6-11).

Bakteriya hər bir restriksiya fermenti üçün ***modifikasiya fermentini*** də istehsal edir, bu sahib bakterianın öz DNT-sini potensial doğranma saytlarında modifikasiya etməklə onu doğranmaqdan qoruyur. Modifikasiya fermenti, adətən restriksiya saytı daxilində bir və ya iki əsasa metil qurupunu əlavə edir. Metil qurupunun orada olaması, restriksiya endinukleazasının DNT-ni kəsməsinə mane olur. Metilləşdirici ferment restriksiya endonukleazası ilə birlikdə restriksiya-modifikasiya sistemini yaradır, bu sistem daxil olan yad DNT-ni (məsələn, bakteriofaq DNT-si və ya transformasiya zamanı keçirilmiş DNT) onun bütün restriksya saytlarında doğramaqla dağıtdığı zaman sahib hüceyrənin DNT-sini mühafizə edir.

Çox restriksiya fermentləri iki DNT zəncirində tanıdıqları saytlarda pilləli kəsiklər edərək hər iki sonluğunda bir zəncirli "quyruq" olan ***yapışqan sonluqlu*** fraqmentləri yaradırlar (bax Şəkil 6-11). Verilmiş restriksya saytında yaranan fraqmentlərdəki quyruqlar eyni restriksya fermenti ilə yaranmış bütün başqa fraqmentlərdəki quyruqlarla komplementardırlar. Otaq temperaturunda, bu birzəncirli rayonlar keçici olaraq eyni restriksiya fermentinin yaratdığı başqa DNT fraqmentlərindəki birzəncirli rayonlarla əsas cütləri əmələ gətirə bilirlər.



ŞƏKİL 6-11 DNT-nin EcoR restriksiya fermenti ilə kəsilməsi. *E. coli*-dən alınmış bu restriksiya fermenti, göstərilmiş 6 nc uzunluqda xüsusi palindrom ardıcıllıqda pilləli kəsiklər edir, nəticədə bir zəncirli, komplementar yapışqan sonluğa malik olan fraqmentlər alınır. Çoxsaylı başqa restriksiya fermentləri də həmçinin yapışqan sonluqlu fraqmentləri əmələ gətirirlər.

Fərdi bir orqanizmdən ayrılmış DNT xüsusi ardıcıllığa malikdir və bu fərdilik xüsusiyyətinə görə də o, spesifik restriksiya saytları dəstinə malik olur. Beləliklə verilmiş restiksiya fermenti xüsusi bir mənbədən ayrılmış DNT molekulunu kəsərək ***restriksiya fraqmentləri*** adlandırılan reproduksiya oluna bilən fraqmentlər dəstini yaradır. Restriksiya fermentinin DNT-ni kəsmə tezliyi və nəticədə əmələ gələn restriksiya fraqmentlərinin orta ölçüsü əsasən tanınma saytlarının uzunluğundan asılıdır. Məsələn, 4 əc-lü saytı tanıyan restriksiya fermenti DNT-ni orta hesabla hər 4^4-dən bir və ya 256 əc-dən bir doğrayacaq, amma 8 əc-lü saytı tanıyan restriksiya fermenti DNT molekulunu hər 4^8 əc-dən bir (~65 kəc) doğrayacaq. Yüzlərlə restriksiya fermentləri müxtəlif bakteriya növlərindən ayrılaraq təmizlənmişdir və bu fermentlər, DNT molekullarını, bu fermentlərin tanıma saytlarına uyğun olaraq

böyük sayda müxtəlif ardıcıllıqda kəsməyə imkan verir (Cədvəl 6-1).

DNT Fraqmentlərinin Vektora Keçirilməsi Hər iki ucu yapışqan sonluqlu və ya küt sonluqlu olan DNT fraqmetləri DNT liqazaların köməyi ilə vektor DNT-sinə keçirilə bilər. Normal DNT replikasiyası zamanı, *DNT liqaza* fermenti, Okazaki fraqmentləri adlandırılan qısa DNT fraqmentlərinin uc-uca birləşməsini (liqasiya prosesini) kataliz edir. DNT klonlaşdırılması məqsədi ilə, restriksiya fraqmentlərinin uclarının və vektor DNT-sinin onlara komplementar olan uclarının kovalent birləşdirilməsi üçün təmizlənmiş DNT liqaza fermenti istifadə olunur (Şəkil 6-12). Vektor DNT-si və restriksiya fraqmenti standart 3′- 5′ DNT fosfodiefir əlaqələri ilə kovalent şəkildə bir yerə liqsiya olunurlar. Komplementar yapışqan ucların liqasiyasından başqa, T4 bakteriofaqın DNT liqazası bütün küt ucluqlu DNT sonluqlarını da liqasiya edə bilir. Amma, küt-ucların liqasiyası mahiyyətcə qeyri səmərəlidir və reaksiya zamanı yapışqan ucların liqasiyası ilə müqayisədə çox yüksək qatılıqda DNT-nin və DNT liqazanın iştirakını tələb edir.

CƏDVƏL 5-1 Seçilmiş Restriksiya Fermentləri və Onların Tanıma Ardıcıllığı

Ferment	Mikroorqanizm Mənbəi	Tanıma Saytı*	Yaranan Sonluqlar
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens*	-G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G-	Yapışqan
*Sau*3A	*Staphylococcus aureus*	-G-A-T-C- -C-T-A-G-	Yapışqan
*Eco*RI	*Escherichia coli*	-G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G-	Yapışqan
*Hind*III	*Haemophilus influenzae*	-A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A-	Yapışqan
*Sma*I	*Serratia marcescens*	-C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C-	Küt
*Not*I	*Nocardia otitidis-caviarum*	-G-C-G-G-C-C-G-C- -C-G-C-C-G-G-C-G-	Yapışqan

*Bu tanıma ardıcıllıqlarının çoxu ümumi polilinker ardıcıllığa daxildir (bax Şəkil 6-13).

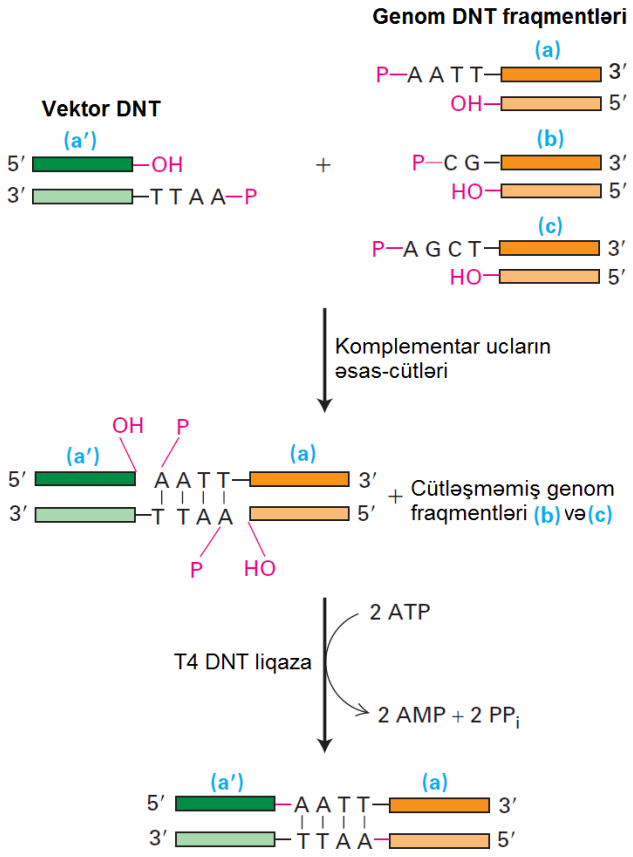
Ayrılmış DNT Fraqmentləri *E.coli* Plazmid Vektorlarına Klonlaşdırıla bilər

Plazmidlər həlqəvi, iki-zəncirli DNT (izDNT – dsDNA) molekulları olub hüceyrənin xromosom DNT-sindən ayrılıqda replikasiya edirlər. Təbii şəkildə bakteriyalarda və ibtidai eukariot hüceyrələrdə (məsələn, maya göbələyində) mövcud olan bu ekstraxromosomal DNT-lər sahib orqanizmlərlə simbioz qarşılıqlı əlaqədə olurlar. Sahib orqanizmin xromosom DNT-si kimi, plazmid DNT-si də hər hüceyrə bölünməsindən öncə ikiləşir. Hüceyrə bölünməsi zamanı plazmid DNT-lərin nüsxələri hər bir yeni qşz hüceyrəyə seqreqasiya edir və hər bir hüceyrə bölünməsi zamanı artaraq yeni əmələ gəlmiş sahib hüceyrəni davamlı şəkildə təmin edirlər.

Rekombinant DNT texnalogiyasında daha çox istifadə olunan plazmidlər adətən *E.coli*-də replikasiya olunanlardır. DNT klonlaşdırmasında onların vektor kimi istifadəsini optimallaşdırmaq üçün tədqiqatçılar bu plazmidləri işləyib hazırladılar. Məsələn, təbii şəkildə *E.coli*-də olan plazmidlərdən lazımsız hissələrinin çıxarılması ilə ~1.2 - 3 kə uzunluqda olan dairəvi plazmid vektorlar alınmışdır və bu plazmidlər DNT klonlaşdırması üçün əhəmiyyətli olan üç rayona malikdir: replikasiya mənşəi (origin − ORI); seçməni aparmağa imkan verən marker, adətən buraya dərmana-dözümlülük geni daxildir; eqzogen DNT fraqmentinin daxil edilə biləcəyi polilinker rayon (Şəkil 6-13).

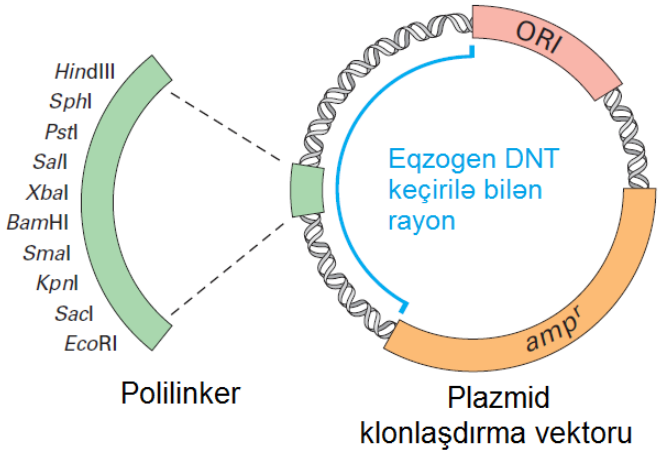
Şəkil 6-14 DNT fraqmentlərinin *E. coli* plazmid vektorundan istifadə edərək klonlaşdırılmasının əsas proseslərini təsvir edir. *E. coli* hüceyrələri rekombinant vektor DNT ilə qarışdırılanda və sonra istilik şoku kimi stresə məruz qoyulanda hüceyrələrin kiçik bir fraksiyası plazmid DNT-ni

götürəcək (qəbul edəcək), bu proses **transformasiya** kimi adlanır. Adətən, 10000 yaxın hüceyrədən biri *tək bir* plazmid DNT-ni qəbul edir və beləliklə transformasiya olunur. Plazmid vektor *E. coli* ilə inkubasiya olunduqda plazmidi götürən az sayda hüceyrələr böyük sayda dıgər hüceyrələrdən seçim markerindən istifadə edərək asanlıqla seçilə bilirlər. Məsələn, transformasiya olunan plazmid ampisillin antibiotikinə davamlılıq geninə malikdir, ona görə də transformasiya olunan hüceyrə tərkibində ampicillin antibiotiki olan mühitdə əkilərkən bitmə qabliyyəti ilə seçilir. İlkin transformasiya olunmuş hüceyrədən əmələ gələn bütün antibiotikə-dözümlü yeni nəsil hüceyrələr eyni DNT keçirilmiş plazmidə malik olacaqdır. Koloniyada olan bütün hüceyrələr tək bir transformasiya olunmuş valideyin hüceyrədən əmələ gəldiyinə görə onlar hüceyrələrin klonunu təşkil edirlər və valideyin plazmidə keçirilmiş ilkin DNT fraqmenti *klonlaşdırılmış DNT* və ya *DNT klonu* adlanır.



ŞƏKİL 6-12 Restriksiya fraqmentlərinin komplementar yapışqan ucluqlara liqasiyası. Bu nümunədə, *Eco*RI ilə kəsilmiş vektor DNT-si genom DNT-dən bir neçə restriksiya fermentləri ilə kəsilib ayrılmış DNT fraqmentlərinin olduğu nümunə ilə qarışdırılır. Hər bir fraqmnetin yapışqan uclardan ibarət olan qısa əsaslı ardıcıllıqları göstərilmişdir. Kəsilmiş vektor DNT-də (a′) olan yapışqan uc genom nümunəsində yalnız *Eco*RI fermentin kəsdiyi komplementar yapışqan ucla əsas cütü əmələ gətirəcək (a). Cütləşmiş fraqmentlərdə yaxınlıqda olan 3′ hidroksil və 5′ fosfat qrupları (qırmızı) sonra T4 DNT liqaza vasitəsi ilə kovalent birləşirlər (liqasiya olunurlar).

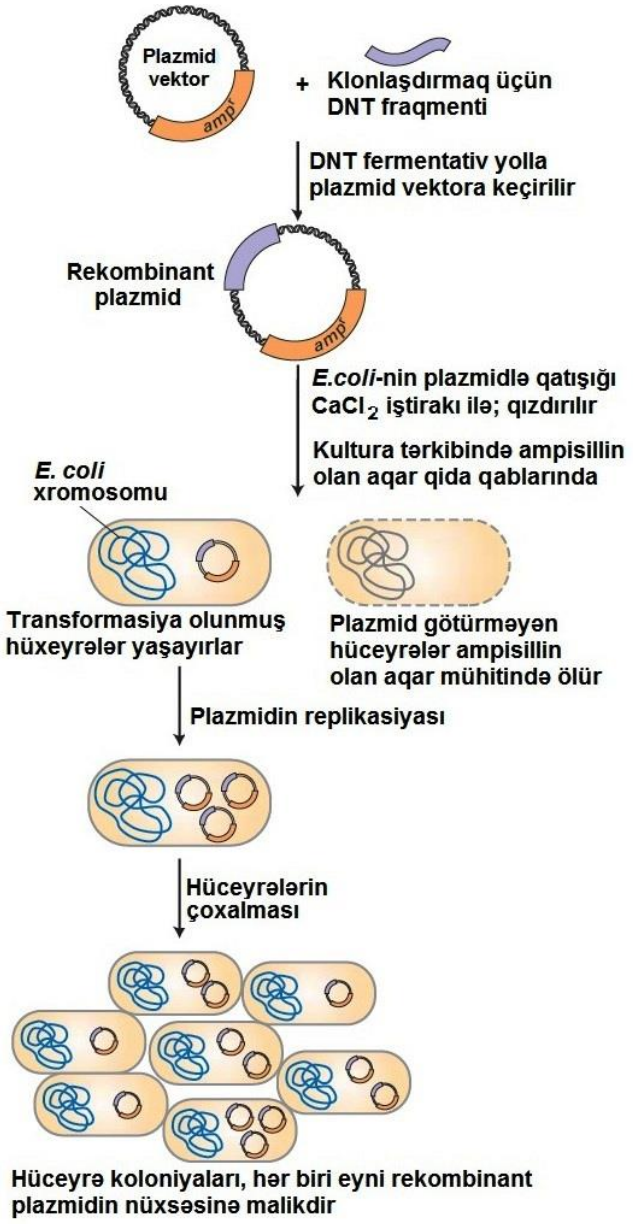
E. coli plazmid vektorların çoxyönlülüyü, sintetik yaradılmış ardıcıllıq olan polilinkerin əlavə olunması ilə artmışdır və bu polilinkerin üstünlüyü ondadır ki, bura daxil olan bir sıra müxtəlif restriksya saytları plazmidin başqa tərkib ardıcıllığı daxilində yoxdur və hər biri tək bir nüsxədədir (bax Şəkil 6-13). Bir qayda olaraq, polilinker preparatda iki müxtəlif restriksiya fermenti ilə kəsilib yapışqan uclara malik olan DNT-ni qəbul edə bilmək üçün uyğun olan iki eyni restriksiya fermentyi ilə kəsilir. Bu cürə strategiya arzuolunmaz kənar məhsulların, məsələn vektorun öz-özünü qapamasının yaranmasından uzaq olur və DNT fraqmentinin klonlaşdırılmasının səmərəliliyini yüksək dərəcədə artırır.



ŞƏKIL 6-13 *E. coli* hüceyrələrində replikasiya edə bilən plazmed klonlaşdırma vektorunun əsas komponentləri. Plazmid vektorlar ***amp*^{r}** kimi seçilmə geninə malikdirlər, bu gen β-laktamaza fermentini kodlaşdırmaqla bakterial hüceyrədə ampisillnə qarşı davamlılıq yaradır. Eqzogen DNT plazmidin replikasiya etmə qabliyyətinə və ya ***amp*^{r}** geninin ekspressiyasına ziyan gətirmədən onun qeyd olunmuş rayonuna keçirilə bilər. Plazmid vektor həmçinin replikasiya mənşəyi (origin – ORI) ardıcıllığına malikdir, burada sahib hüceyrənin fermentləri tərəfindən DNT-nin replikasiyası inisiasiya olunur. Bir sıra müxtəlif restriksiya fermentləri tərəfindən tanıma ardıcıllığına malik olan sintetik polilinkerin daxil edilməsi plazmid vektorun çoxtərəfli istifadə qabliyyətini artırır. Vektor elə dizayn olunmuşdur ki, polilinkerdə olan restriksiya saytları plazmiddə unikaldır, təkrar olunmur.

Plazmid klonlaşdırma vektorları 20 k.ə.c. qədər uzunluqda olan DNT fraqmentlərini artırmaq üçün faydalıdır, amma bundan uzun olan fraqment bir hüceyrə bölünməsi daxilndə replikasiya etmək üçün etibarlı deyil. Bəzi məqsədlərlə, məsələn insan genomunun böyük seqmentlərini ayırmaq və manipulyasiya etmək üçün DNT seqmentlərini meqa-əsas cütlərlə ölçülən [1 meqa-əsas (Mə) = 1 million əsas cütü] çox böyük fraqmenti klonlaşdırmaq lazım olur. Bu məgsədlə, BAC-lardan (bakterial sintetik xromosomlar) adlandırılan xüsusiləşmiş plazmid vektor yaradılıb inkişaf etdirilmişdir. BAC-ların bir tipində istifadə olunan **replikasiya mənşəyi** *E. coli*-nin *F faktor* kimi məlum olan plazmidindən alınmışdır. F faktor və ondan ayrılmış klonlaşdırma vektorları hər bir *E. coli* hüceyrəsində, hətta onlara 2Mə DNT fraqmenti keçirildikdə belə bir nüsxədə stabil saxlanıla bilir. BAC kitabxanasının yaradılması, böyük DNT fraqmentlərinin ayrılması, liqasiyası və transformasiyası üçün xüsusi metodlar tələb olunr, çünki təxminən 20 kə-dan böyük DNT seqmentləri, hətta pipetka ilə

götürmə kimi sadə manipulyasiyalar zamanı belə mexaniki qırılmaya yüksək dərəcədə meyillidirlər.



EKSPERIMENTAL ŞƏKIL 6-14 DNT-nin plazmid vektora klonlaşdırılması DNT fraqmentlərinin amplifikasiyasına imkan yaradır. Klonlaşdırma üçün olan DNT fraqmenti birinci, Şəkil 6-13də göstərildiy kimi, ampisillinə dözümlülük geninə (***amp*** ^{r}) malik olan vektora daxil edilir. Plazmidlə birləşmiş yalnız bir neçə transformasiya olunan hüceyrə ampisillin olan mühitdə bitəcəkdir. Transformasiya olunmuş hüceyrələrdə plazmid DNT replikasiya olunur və yeni qız hüceyrələrə seqreqasiya edir, nəticədə hər bir hüceyrəsində klonlaşdırılmış DNT olan ampisillinə dözümlü koloniya alınır.

Maya Genom Kitabxanaları Şatl Vektorla Qurula və Funksional Komplementasiya Vasitəsilə Ekranlaşdırıla bilər

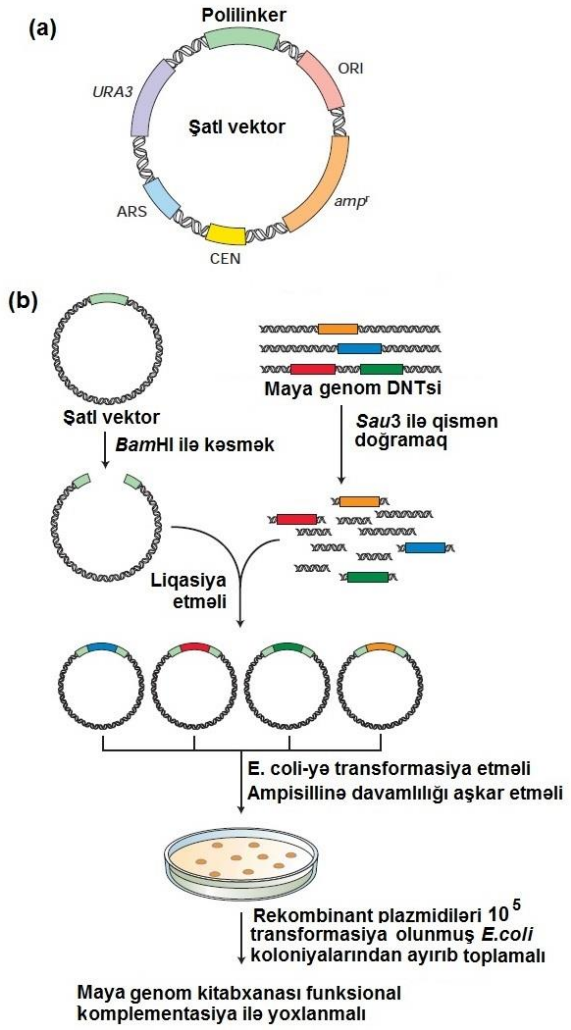
Vektor molekullarına klonlaşdırılmış DNT molekullarının kolleksiyası **DNT kitabxanası** kimi məlumdur. Müəyyən bir orqanizmin DNT-sı başlanğıc DNT-nin mənbəyi olanda, genomda olan bütün DNT ardlıcıllığını kollektiv şəkildə təmsil edən klonlar ***dəsti genom kitabxanası*** adlandırılır. Bəzi hallarda DNT kitabxanası resesiv mutasiyanı tamamlayan funksional zülalın ekspressiya olunmaq qabliyyəti üçün ekranlaşdırıla bilir. Bu cürə ekranlaşdırma strategiyası, eksperimental orqanizmdə aşkar edilmiş maraq resesiv mutasiyaya uyğun olan klonlaşdırılmış genin ayrılması üçün səmərəli yol olmalıdır. **Funksional komplementasiya** kimi adlandırılan bu metodu izah etməkdən ötrü biz, mutant ştammlarda qüsurlu olan təbii forma genlərini təyin etmək üçün xüsusi *E. coli* plazmidinə klonlaşdırılmış maya genlərinin mutant maya hüceyrələrinə necə keçirildiyini təsvir edirik. *Saccharomyces* genləri çoxsaylı intronlara malik olmadığından onlar kifayət qədər kompaktdırlar və 10-a qədər çoxsaylı gendən ibarət olan bütöv bir ardıcıllıqa malik olan DNT fraqmentində plazmid vektoruna keçirilə bilir.

Maya hüceyrələrində funksional komplementasiya yolu ilə ekranlaşdırılmalı olan plazmid genom kitabxanasını yaratmaq üçün, plazmid vektor həm *E. coli* həm də maya hüceyrələrində replikasiya etmək qabliyyətinə malik olmalıdır. İki müxtəlif sahib hüceyrədə artmaq qabliyyətinə malik olan bu tip bvektor *şatl vektor* adlanır. Tipik maya şatl vektoru Şəkil 6-15a-da göstərilmişdir. Bu vektor DNT fraqmentlərinin və eləcə də onun çoxalması üçün tələb olunan ardıcıllığın *E. coli* hüceyrələrinə klonlaşdırılmasına imkan verən əsas elementlərə malik olur.

Maya genomunun bütün rayonlarının klonlaşdırılaraq plazmid kitabxanasında təsvir olunma ehtimalını artırmaq üçün, ~10 kə ölçülü üst-üstə düşən restriksiya fraqmentlərini almaq məqsədi ilə adətən genom DNT-si gismən doğranır. Bu fraqmentlər, sonra polilinkeri maya göbələyinin DNT fraqmentlərinə komplementar yapışqan ucluqlar əmələ gətirən restriksiya fermenti ilə kəsilmiş şatl vektora liqasiya olunurlar (Şəkil 6-15b). Maya DNT-sinin 10-kə restriksiya fraqmentləri şatl vektora nizamsız birləşdiyindən hər biri xüsusi şatl vektora malik olan ən azı 10^5 *E. coli* koloniyası lazımdır ki, maya göbələyi DNT-nin hər bir rayonunun yüksək ehtimalla kitabxanada ən azı bir dəfə təmsil edildiyi təmin olunsun.

Şəkil 6-16, bu fəsilin əvvəlində qeyd olunan, temperatura həssa ***cdc*** mutantlardan birinə uyğun olan təbii-forma genini ayırmaq üçün bu cürə maya genom kitabxanasının necə ekranlaşdırıla biləcəyini təsvir edir. Başlanğıc maya ştammı fenotipinə görə təyin edilmiş ikiqat mutant olub, *ura3* mutasiyasına görə bitmək üçün urasilin olmasını tələb edir, *cdc28* mutasiyasına görə isə temperatura həssasdır (bax Şəkil 6-6). Maya genomu kitabxanasından ayrılan rekombinant plazmidlər xarici DNT ilə hüceyrə transformasiyasını sürətləndirən şərait altında maya hüceyrələri ilə qatışdırılmışdır. Transformasiya olunmuş maya hüceyrələri *URA3* genin plazmiddə-daşınan nüsxəsinə malik olduğundan onlar, urasil iştirak etməyən şəraitdə bitmə qabliyyətinə görə seçilə bilirlər. Adətən, hər biri təxminən 500 maya transformantları olan 20 qədər petri qabı tam maya genomunu təmsil etməyə kifayət edir. Maya transformantlarının bu kolleksiyası, *cdc28* mutantının bitməsi üçün yolverilən-temperaturda, 23°C-də saxlanıla bilər. 20 lövhə üzərində olan tam kolleksiya sonra, *cdc* mutantlar üçün yolverilməyən-temperaturda, 36°C-də yerləşdirilmiş replika (tam surəti olan) lövhələrə keçirilir. Təbii-formalı *CDC28* genini ekspressiya edən rekombinant plazmidlərə malik olan maya koloniyaları

36°C-də bitmə qabliyyətinə malik olacaq. Temperatura-dözümlü maya koloniyaları təyin olunduqdan sonra, plazmid DNT-ni kultura olunan maya hüceyrələrindən ayırıb müvafiq DNT ardıcıllığına görə analiz etmək olur, bu mövzu tezliklə müzakirə olunacaq.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-15 Maya genom kitabxanası mayada və *E. coli*-də replikasiya edə bilən plazmid şatl vektorda konstruksiya oluna bilər. (a) *Saccharomyces* genlərini klonlaşdırmaq üçün istifadə olunan tipik plazmid şatl vektorun komponentləri. Maya üçün DNT replikasiya mənşəyinin (ARS) və maya sentromerinin (CEN) olması mayada stabil replikasiyaya və seqreqasiyaya imkan yaradır. Buraya urasil olmayan mühitdə bitmə qabliyyətini itirən *ura*3 mutantın alınmasına imkan verən *URA*3 kimi maya seçmə markeri daxildir. Nəhayət, vektor *E. coli* hüceyrələrində replikasiya etmək və seçə bilmək ardıcıllıqlarına (ORI və *amp*) və maya DNT fraqmentlərini daxil etmək üçün polilinkler hissəsinə malikdir. (b) Maya genom kitabxanasını qurmaq üçün tipik protokol. Maya göbələyinin ümumi genom DNT-nin *Sau*3A ilə qismən doğranması orta ölçüsü təxminən 10 kə olan fraqmentləri əmələ gətirməyə tənzimlənmişdir. Vektor, *Sau*3 ilə eyni yapışqan ucluqlar əmələ gətirən *Bam*HI fermenti ilə kəsilməklə genom fraqmentlərini qəbul etmək üçün hazırlanmışdır. Ampisillinə-dözümlülüyə görə seçildikdən sonra bitən *E. coli*-nin hər bir transformasiya olunmuş klonu bir tip maya DNT fraqmentinə malik olur.

kDNT Kitabxanaları Zülal-Kodlaşdıran Genlərin Ardıcıllığını Təmsil Edir

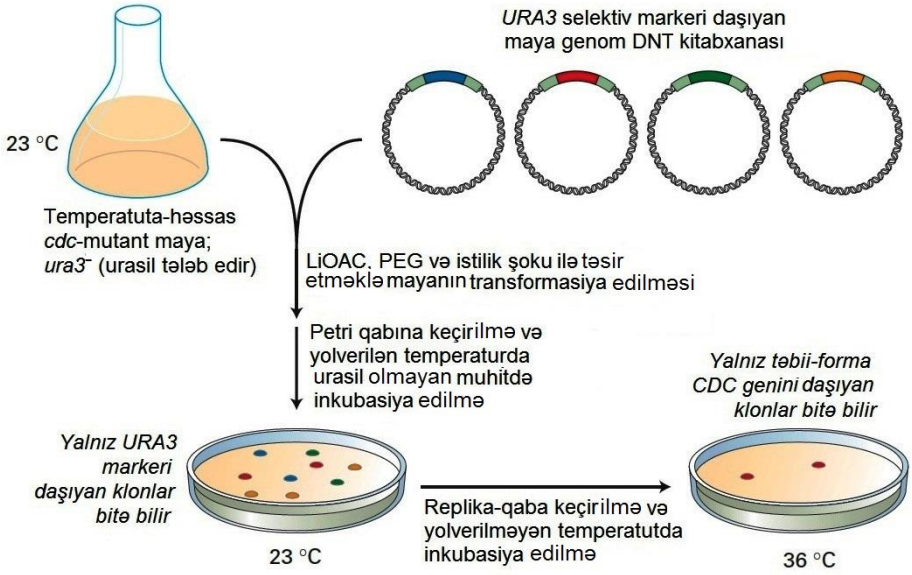
Genom kitabxanaları bakteriya və maya kimi müqayisəli dərəcədə sadə orqanizmlərin genetik tərkibini təmsil etmək üçün idealdır, amma ali eukariotlar üçün onun alınmasında bir sıra çətinliklər yaranır. Birincisi, belə orqanizmlərin genləri adətən böyük intron ardıcıllığına malik olurlar və ona görə də onlar intakt şəkildə plazmid vektora keçirilmək üçün çox böyük olurlar. Nəticədə hər bir fərdi genin ardıcıllığı hissələrə (fraqmentlərə) bölünür və birdən artıq klona yerləşdirilir. Bundan başqa, genom DNT-sində intronların və uzun genlərarası rayonların olması çox hallarda zülal ardıcıllığını kodlaşdıran genin əhəmiyyətli hissəsini identifikasiya etməyi çətinləşdirir. Məsələn, insan genomunun əslində yalnız 1.5 faizi zülal kodlaşdıran genlərin ardıcıllığını təşkil edir. Beləliklə, çoxsaylı tədqiqatlar üçün, genom DNT-sindəki kodlaşdırmayan zonaya malik olmayan huceyrə mRNT-ləri DNT kitabxanasının yaradılması üçün daha əhəmiyyətli başlanğıc materialdır. Bu yanaşmada, **mRNT**-lərin **komplementar DNT-lər (kDNT-lər)** adlandırılan DNT surətləri, sintez olunaraq plazmid vektora klonlaşdırılır. Hüceyrədə ekspressiya olunan bütün mRNT-ləri təmsil edən alınmış kDNT-lərin böyük miqdarda toplusu (kolleksiyası) ***kDNT kitabxanası*** adlandırılır.

kDNT kitabxanasını yaratmaq üçün birinci pillə hüceyrə tipindən və ya tədqiqat toxumasından ümumi mRNT fraksiyasının ayrılmasıdır. mRNT-lərdə poli(A) quyruq olduğundan, onları hüceyrə ekstraktında daha zəngin olan ümumi rRNT və tRNT fraksiyalarından timidinləşmiş (oliqo-dT-lər) tikilmiş matrisadan ibarət olan kolonkadan istifadə etməklə asanlıqla ayırmaq olur. Hüceyrənin mRNT qatışığından kDNT kitabxanasının hazırlanmasının ümumi üsulu (tam prosedur) Şəkil 6-17-də göstərilmişdir. Retroviruslarda tapılmış geriyə transkriptaza fermentini istifadə etməklə, Oliqo-dT praymerlərdən başlayaraq (pillə 1 və 2), hər bir mRNT molekuluna komplementar olan DNT zənciri sintez olunur. Nəticədə əmələ gələn kDNT-mRNT hibrid molekul bir neçə mərhələdən keçərək, bütün mRNT-lərə uyğun olan iki-zəncirli kDNT molekuluna çevrilir (pillə 3-5). Hər bir iki-zəncirli kDNT bir ucunda oliqo-dC•oliqo-dG ikiqat zəncir rayonuna və diggər ucunda isə oliqo-dT•-oliqo-dA iki-qat zəncir rayona malik olur. kDNT-nin metilləşməsi onu müvafiq restriksiya fermentləri tərəfindən doğranmaqdan müdafiə edir (pillə 6).

İki-zəncirli kDNT-ləri klonlaşdırmaya hazırlamaq üçün, T4 bakteriofaqın DNT liqazasından istifadə etməklə kDNT-nin hər iki ucuna xüsusi restriksiya fermentləri tərəfindən tanına bilən (*linkerlər* adlanan) sayta malik olan qısa iki-zəncirli DNT molekulları liqasiya edilir (Şəkil 6-17, pillə 7). Əvvəldə qeyd olunduğu kimi, bu liqaza yapışqan uclara malik olmayan "küt-sonluqlu" iki-zəncirli DNT molekullarını birləşdirə bilir. Nəticədə əmələ gələn bu molekullara sonra yapışdırılmış linkerə spesifik olan restriksiya fermentləri ilə təsir edilir və yapışqan uclara malik olan kDNT molekulu yaradılır (pillə 8a). Ayrıca bir prosesdə, müvafiq yapışqan sonluqları almaq üçün plazmid DNT eyni restriksiya fermentləri ilə kəsilir (pillə 8b).

Hər biri komplementar yapışqan uclara malik olan vektorun və kDNT-lərin toplusu (kolleksiyası) sonra qarışdırılaraq DNT liqaza vasitəsiilə kovalent birləşdirilirlər (Şəkil 6-17, pillə 9). Nəticədə əmələ gəlmiş DNT molekulları, fərdi klonları almaq üçün *E.coli* hüceyrələrinə keçirilir, hər bir klon, vahid bir mRNT-dən alınmış kDNT-yə malik olur.

Müxtəlif genlər çox müxtəlif dərəcələrdə transkripsiya olunduqlarından, zəngin transkripsiya olunan genlərə uyğun olan kDNT klonları kDNT kitavxanasında çox sayda təmsil olunacaqlar, halbuki çox aşağı sürətlə transkripsiya olunan genlərə müvafiq olan kDNT-lər həddən artıq seyrək olacaq və ya heç tamamilə olmayacaq. Aşağı sürətlə transkripsiya olunan genlərə uyğun kDNT klonlarının alınmasının ağılabatan imkanına malik olmaq üçün, məməlilərin kDNT kitabxanasında 10^6-10^7 fərdi rekombinant klon olmalıdır.

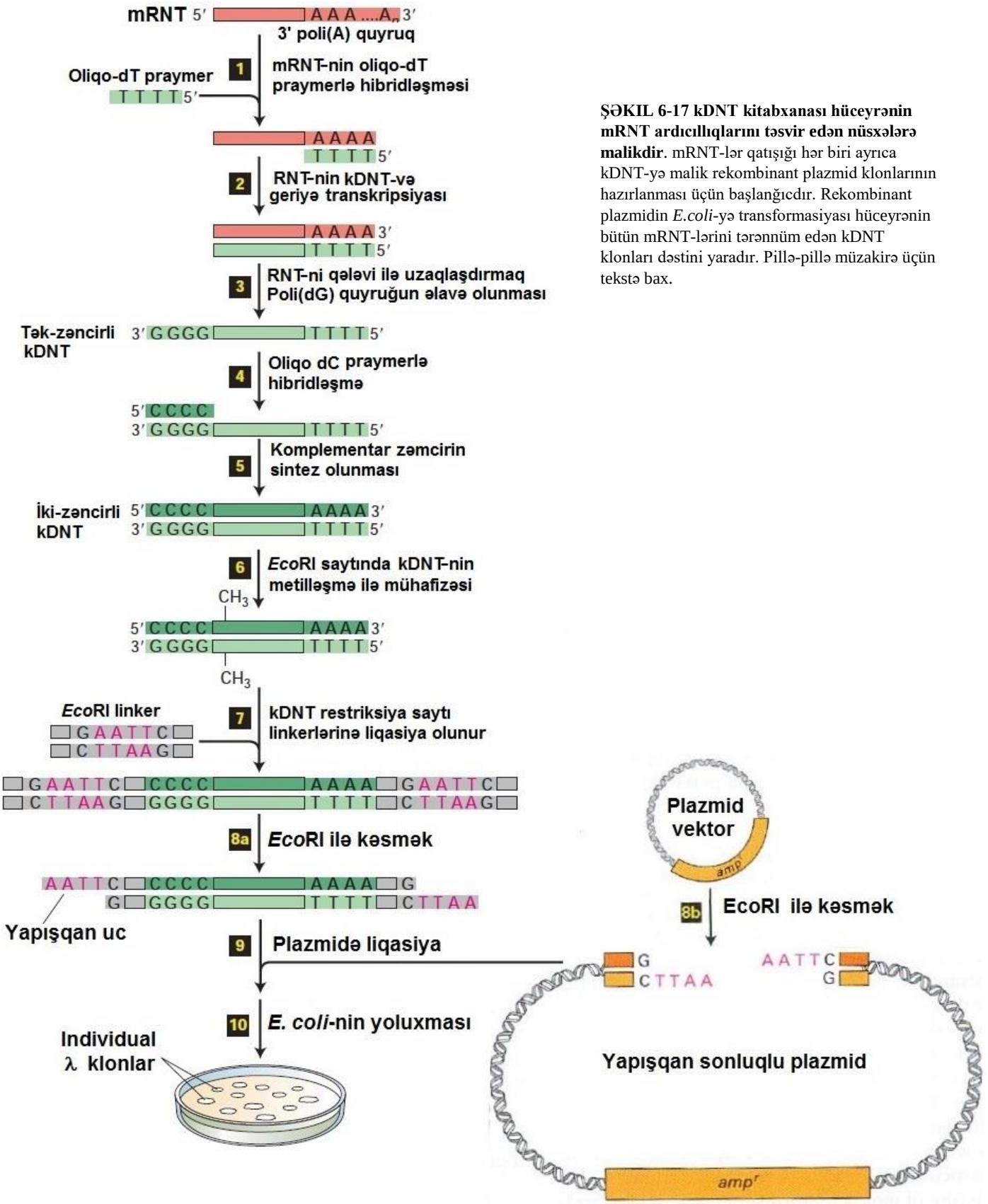


EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-16 Maya genom kitabxanasının funksional komplementasiya yolu ilə ekranlaşdırılması mutant maya genlərinin normal formasına daşıyan klonları təyin edə bilər. Bu nümunədə, təbii forma *CDC* geni *cdc* maya mutantının komplementasiyası yolu ilə ayrılmışdır. Şəkil 6-15-də göstərildiyi kimi, hazırlanmış rekombinant plazmidlərin toplusu temperatura həssas cdc mutant ştamm *ura3*⁻ daxilinə transformasiya olunur. Rekombinant DNT-yə malik olan nisbətən az sayda transformasiya olunmuş maya hüceyrələri 23°C-də, urasil olmayan şəraitdə bitə bilirlər. Bu koloniyalar replika-lövhəyə keçiriləndə və 36°C-də (yolverilməyən temperaturda) inkubasiya olunduqda yalnız tərkibində *CDC* genin təbii forması olan kitabxana plazmidlərini daşıyan koloniyalar sağ qalacaqlar. LiOAC = litium asetat; PEG = polietilen qlikol.

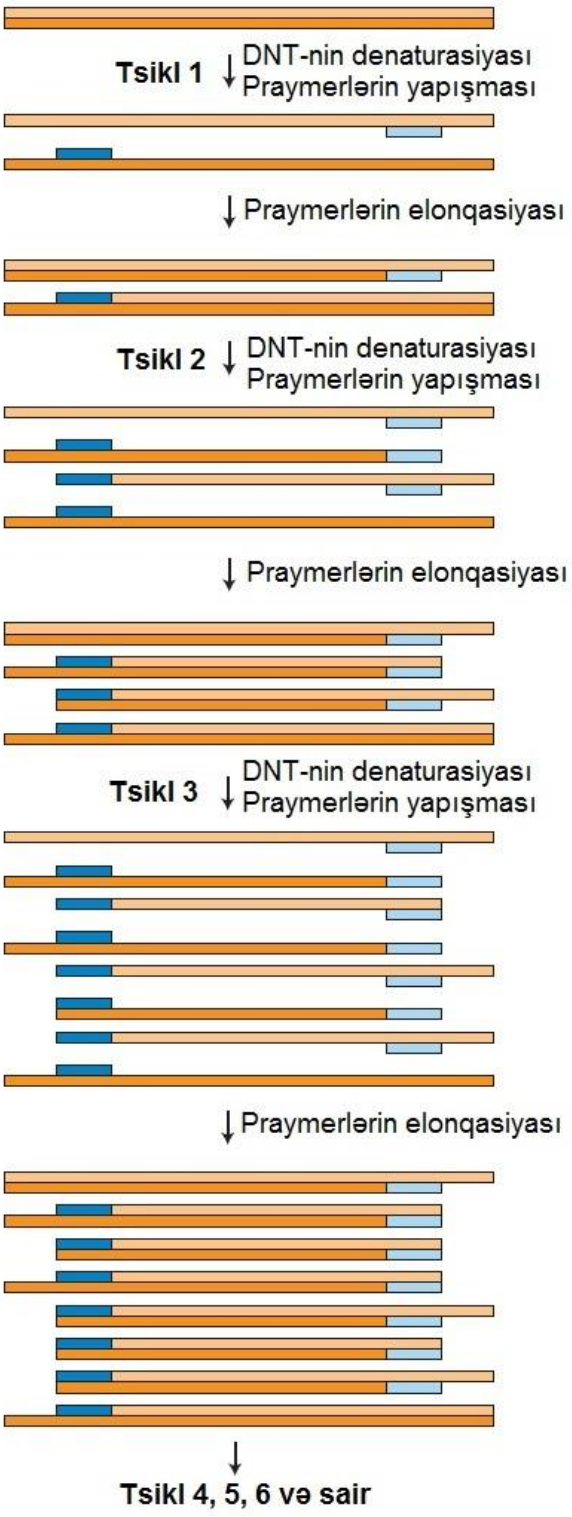
Polimeraza Zəncirvari Reaksiyası Xüsusi DNT ardıcıllığını Kompleks Qatışıqdan Amplifikasiya Edir

Əgər xüsusi DNT rayonunun uclarındakı DNT ardıcıllıqları məlumdursa bu ucluqları birləşdirən aralıq fraqment **polimeraza zəncirvari reaksiyası** (**PZR**) vasitəsi ilə birbaşa amplifikasiya oluna bilər. Burada biz PZR metodunun əsaslarını və onun istifadə olunduğu üç əsas vəziyyəti izah edirik.

PZR, ikizəncirli DNT molekulunun bir-birinin ardınca denaturasiya olmasından (əriməsindən) və komplementar tək zəncirələrə nəzarət ounan formada hibridləşmədən asılıdır. Şəkil 6-18-də göstərildiyi kimi, tipik PZR prosesi DNT nümunəsinin 95°C-də qızdırılaraq tək zəncirlərə denaturasiya edilməsi ilə başlayır. Sonra, hədəf DNT-nin maraq seqmentinin 3′ sonluğuna komplementar olan iki sintetik oliqonukleotid çox yüksək qatılıqda denaturasiya olunmuş DNT-yə əlavə olunur və temperatur 50-60°C endirilir. Yüksək qatılıqda olan bu spesifik oliqonuklıeotidlər, DNT nümunəsində onlara komplementar olan ardıcıllıqla hibridləşəcəklər, halbuki uzun DNT zəncirləri aşağı qatılıqda olduğundan bir-birindən kənarda qalırlar. Hibridləşmiş oliqonukleotidlər sonra DNT zəncirlərinin sintezi üçün praymer rolunu oynayaraq dezoksinukleotidlərin (dNTP-lər) və temperatura davamlı DNT polimerazanın, məsələn *Thermus acuaticus*-dan (qaynar bulaq suyunda yaşayan bakteriya) alınmış DNT poliomerazanın iştirakı ilə yeni DNT zəncirlərinin sintezini həyata keçirirlər. Polimerləşməni həyata keçirən, *Taq-DNT-polimeraza* adlandırılann bu ferment hətta 95°C-də qızdırıldıqda belə yenə də öz fəallığını saxlayır və praymerlərin uzunamasını (polimerləməni) 72°C teperaturda həyata keçirir. Sintez qurtardıqdan sonra yeni sintez olunmuş DNT dupleks zəncirlərini denaturasiya etmək üçün bütöv qatışıq 95°C-də qızdırılır. Sonra temperatur yenidən aşağı salındıqda sintezin yeni tsikli başlayır, çünki ilk əlavə olunmuş praymerlərin artıq miqdarı hələ də mövcuddur. Denaturasiyanın (qızdırmağın) təkrar olunan tsiklləri hibridləşmə ilə və sintez (soyutma) ilə davam edir və yeni maraq ardıcıllığının sürətli amplifikasiyasını həyata keçirir. Hər bir tsiklda, praymerlərlə cütləşən ardıcıllığın nüxsələrinin sayı iki dəfə artır, ona görə də nəzərdə tutulmuş (yeni) ardıcıllıq həndəsi silsilə ilə artır təxminən 20 tsikldən sonra milllion dəfə artır, halbu ki, templat DNT-nin qalan bütün ardıcıllıqları artmamış (amplifikasiya olunmamış) qalır.



ŞƏKIL 6-17 kDNT kitabxanası hüceyrənin mRNT ardıcıllıqlarını təsvir edən nüsxələrə malikdir. mRNT-lər qatışığı hər biri ayrıca kDNT-yə malik rekombinant plazmid klonlarının hazırlanması üçün başlanğıcdır. Rekombinant plazmidin *E.coli*-yə transformasiyası hüceyrənin bütün mRNT-lərini tərənnüm edən kDNT klonları dəstini yaradır. Pillə-pillə müzakirə üçün tekstə bax.



ŞƏKİL 6-18 Polimeraza zəncirvari reaksiya (PZR) məlum olan DNT ardıcıllığı rayonunu amplifikasiya etmək üçün geniş istifadə olunur. DNT-nin xüsusi rayonunun amplifikasiya etmək üçün tədqiqatçı, DNT zəncirinin maraq zonasının uc zonalarına komplementar olan, təxminən 18 əsas uzunluqda iki müxtəlif oliqonukleotid praymeri kimyəvi yolla sintez edəcək (açıq göy və tünd göy rəngli torlarla verilmişdir). Tam reaksiya, iki-zəncirli templeyt DNT-nin (adətən hədəf maraq ardıcıllığına malik olan), hər iki praymerin stexiometrik artıqlığının, dörd dezoksinukleotid trifosfatların, və *Taq*-polimeraza kimi tanınan, istiliyə davamlı DNT polimerazanın mürəkkəb qatışıqdan təşkil olunub. Hər PZR tsiklində reaksiya qarışığı birinci, DNT zəncirlərini ayırmaq üçün qızdırılır, sonra soyudularaq praymerlərin amplifikasiya olunan rayonun uclarındakı komplementar ardıcıllıqlara birləşməsinə imkan verilir. Sonra, *Taq* polimeraza hər bir praymeri onun 3′ sonluğundan uzunadır və templat zəncirin 3′ sonluqundan 5′ sonluğuna doğru istiqamətində yeni zəncirin sintezini həyata keçirir. Üçüncü tsikl zamanı, amplifikasiya olunan rayonun ardıcıllığına tam bərabər iki yeni iki-zəncirli DNTmolekulları yaradılır. Hər bir ardıcıl tsikldə, praymerlə birləşən hədəf seqment ikiləşir və sonda reaksiya qatışığında DNT-nin başqa seqmentlərinə nisbətən həddən artıq böyük miqdarda artır. Ardıcıl PZR tsiklləri avtomatik olaraq müəyyən zaman intervalında əvvəlcə yuxarı temeperaturda DNT-nin əriməsi, və sonra aşağı temperaturda praymerlərin yapışması və sonra uzunaması hissələri ilə dövrə edir. 20 tsikl reaksiya təkrarından sonra spesifik hədəf DNT fraqmenty bir million dəfə amplifikasiya olunur.

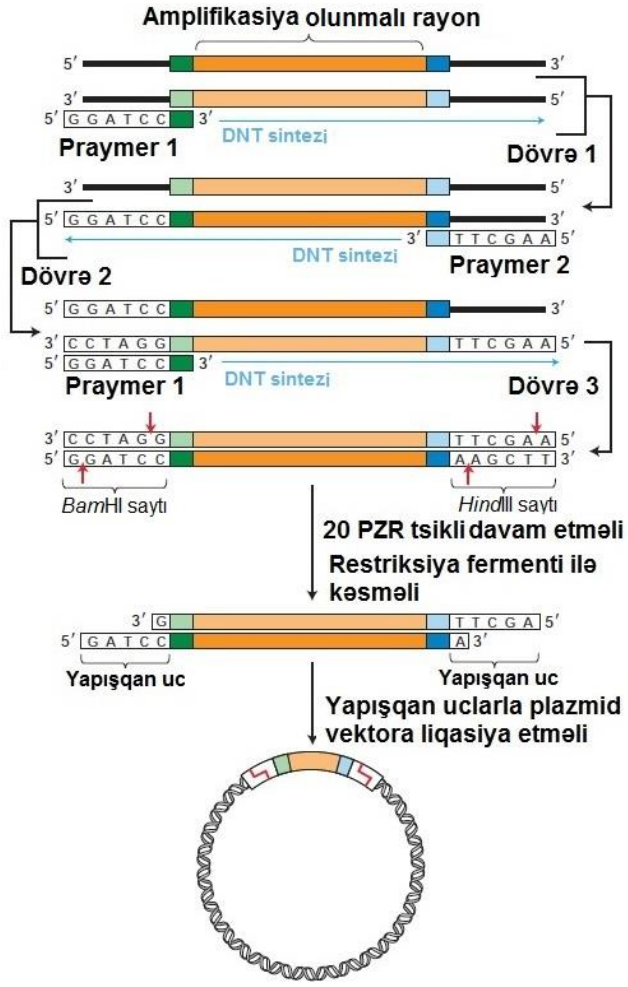
Genom DNT-nin Xüsusi Bir Seqmentinin Birbaşa Ayırılması Tam genomu və ya genomunun çox hissəsi oxunmuş orqanizmlərdə ümumi genom DNT-si ilə aparılan PZR amplifikasiya çox hallarda klonlaşdırma məqsədi ilə spesifik maraq DNT-si rayonunun əldə olumması üçün asan yoldur. PZR-in bu tətbiqində, iki oliqonukleotod praymer genomun maraq rayonunun uclarında olan ardıcıllığa hibridləşmək üçün dizayn olunurlar və onlara xüsusi restriksiya fermentlərinin tanıma saytları daxil edilir (Şəkil 6-19). PZR praymeri kimi sərfəli olan oliqonukleotidin uzunluğu genomda onun unikal rast gəlməsi üçün kifayət qədər uzun olmalıdır. Əksər məqsədlər üçün bu şərait 20 nukleotiddən. ibarət olan oliqonukleotidlər kifayət edir. Verilmiş istənilən 20 nukleotid uzunluqda ardıcıllıq hər 4^{20} ($\sim 10^{12}$) nukleotiddən bir ehtimalı ilə baş verə bilir, beləliklə hədəf ardıcıllığın uclarına spesifik olan 20 nukleotid ardıcıllıqlı genomda yalnız bir dəfə rast gəlinə bilir

Arzu olunan hədəf ardıcıllığın təxminən 20 tsikl amplifikasiyasından sonra, uyğun olan restriksiya fermenti ilə kəsilməsi yapışqan ucları yaradır, bu da fraqmentin eyni restriksiya fermenti ilə kəsilmiş plazmid vektorun polilinkerinə səmərəli şəkildə liqasiya olunmasına imkan yaradır. Nəticədə alınmiş, eyni genom DNT seqmentini daşıyan rekombinant plazmid vektor sonra *E. coli* hüceyrələrinə klonlaşdırıla bilər. PZR-da müəyyən təkmilləşdirmələr etməklə, hətta 10 kə uzunluqdan artıq DNT seqmentləri bu yolla amplifikasiya olunaraq klonlaşdırıla bilər.

Qeyd etmək lazımdır ki, bu metod, genom DNT-dən ayrılmış böyük miqdarda restriksiya fraqmentlərinin klonlaşdırılmasını və xüsusi maraq fraqmentini təyin etmək üçün onların ekranlaşdırılmasını tələb edilmir. Əslində, PZR metodu bu ənənəvi (klassik) yanaşmanı dəyişir və onun əsas yorucu aspektlərindən yan keçir. PZR metodu, sonra təsvir olunan müxtəlif faydalı yollar və məqsədlər üçün istifadə olunan gen ardıcıllıqlarının ayrılması baxımından sərfəlidir. Bundan əlavə, PZR metodu, mutant genlərin təbii-forma genlərdən fərqini təyin etmək üçün mutant orqanizmlərdən gen ardıcıllıqlarının ayrılmasında da iastifadə oluna bilər.

PZR metodundakı variasiya xüsusi kDNT ardıcıllığını hüceyrə mRNT-sindən PZR amplifikasiya edib ayırmağa imkan verir. *Geriyə-transkriptaza-PZR* (*RT-PZR*) (*reverse-transcriptase-PCR – RT-PCR*) kimi məlum olan bu metod, hüceyrənin ümumi mRNT fraksiyasından kDNT-nin ayrılması

üçün əvəlr təsvir olunmuş eyni proseslə başlayır. Adətən, mRNT-nin 3'-poli(A) quyruğuna hibridləşən oliqo-dT praymerlər qeriyə-transkriptaza zamanı DNT-nin birinci zəncirinin sintezi üçün praymer kimi istifadə olunur. Sonra uyğun mRNT ardıcıllığının 5′ və 3′ sonluqlarına komplementar ardıcıllıqda dizayn olunmuş iki oliqonukleotid praymerdən istifadə edərək PZR amplifikasiya yolu ilə kDNT-lərin kompleks (mürəkkəb) qatışığından xüsusi kDNT-ni ayırmaq olar. Əvəllər təsvir olunduğu kimi, bu praymerlər dizayn olunarkən onlara restriksiya saytları əlavə olunur, bu saytlardan istifadə etməklə amplifikasiya olunaraq ayrılmış kDNT uyğun plazmid vektora keçirilir.



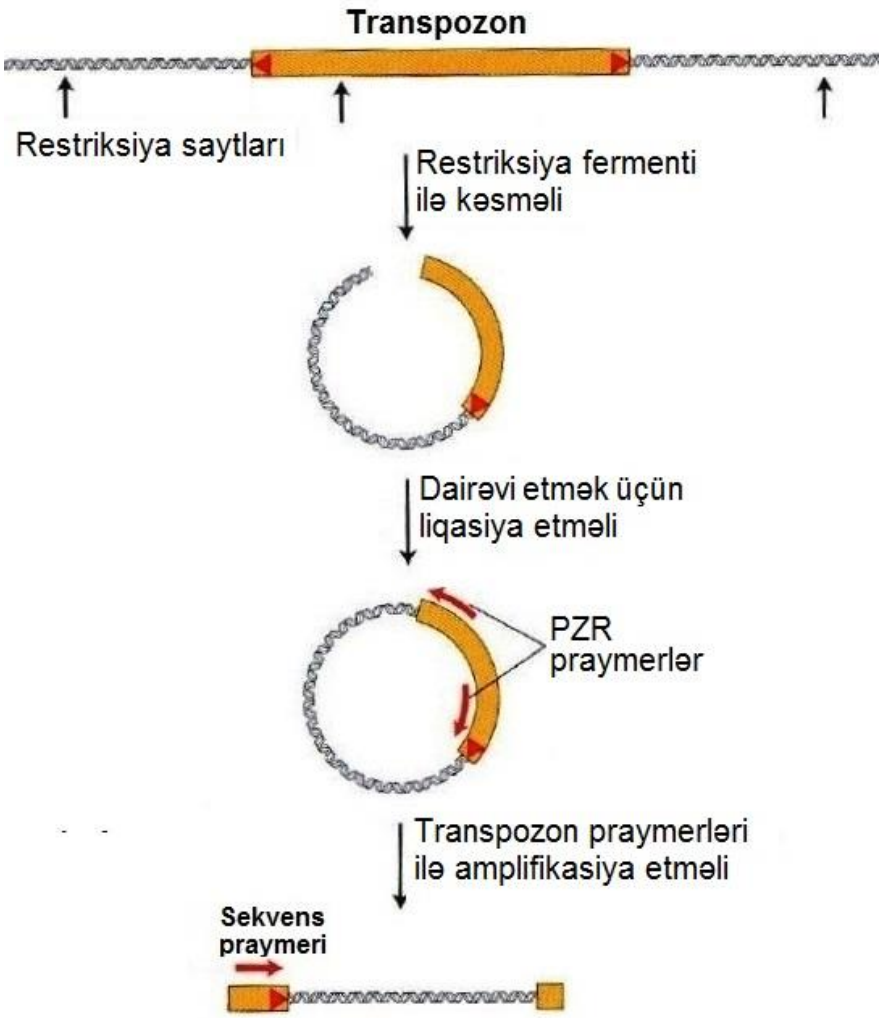
EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-19 Total genom DNT-nin xüsusi hədəf rayonu klonlaşdırma üçün PZR yolu ilə amplifikasiya oluna bilər. PZR üçün istifadə olunan hər bir praymer hədəf ardıcıllığın bir ucuna komplementardır və tərkibində, hədəf zonasında olmayan restriksiya fermenti tərəfindən tanınan ardıcıllığa malikdir. Bu nümunədə, praymer-1 *Bam*HI tanınma ardıcıllığına malikdir, praymer-2 isə *Hind*III tanınma ardıcıllığına malikdir. (Qeyd etmək lazımdır ki, aydınlıq üçün iki zəncirdən yalnız birinin istənilən amplifikasiya tsikli – mötərizədə – göstərilmişdir.) Amplifikasiyadan sonra, hədəf seqmentləri müvafiq restriksiya fermentləri ilə kəsilir və yapışqan uclara malik olan fraqmentlər alınır. Bunlar komplementar plazmid vektorlara birləşdirilir və ənənəvi üsulla *E. coli* hüceyrələrinə klonlaşdırılır (bax Şəkil 6-14).

RT-PZR elə həyata keçirilə bilər ki, hüceyrənin xüsusi mRNT-sinin ilkin miqdarı dəqiqliklə müəyyən oluna bilsin. Miqdari-RT-PZR reaksiyasını həyata keçirmək üçün hər bir amplifikasiya tsiklində yaranmış iki-zəncirli DNT ardıcıllığı xüsusi mRNT ardıcıllığının amplifikasiyasının gedişi kimi təyin edilir. Bu miqdardan ekstrapolyasiya etməklə mRNT ardıcıllığının başlanğıc miqdarının qiymətləndirilməsi əldə oluna bilər. Bu cürə miqdari-RT-PZR analizləri, maraq geninin ardıcıllığını hədəf edən praymerlərdən istifadə edərək tuxuma və ya bütöv orqanizm üzərində aparılır və genlərin ekspressiyasındakı dəyişikliklərin öyrənilməsində ən dəqiq metodu təqdim edir.

İnsersiya Mutasiyası ilə Genlərin Yarlıklanması (Nişanlanması) PZR-in başqa əhəmiyyətli tətbiqi, mutant ştammın genom DNT-sindən "yarlıklanmış" genin amplifikasiya olunmasıdır. Bu yanaşma, xüsusi mutant fenotiplə bağlı olan genlərin identifikasiyası üçün funksional komplementasiya yolu ilə kitabxananın ekranlaşdırılmasından daha sadə bir metoddur (bax Şəkil 6-16).

PZR metodunun belə istifadə olunmasının açarı, eksperimental orqanizmin genomuna məlum DNT ardıcıllığının daxil edilməsi (insersiyası) yolu ilə mutasiyanı yarada bilmək imkanıdır. Bu cürə **insersiya mutasiyası**, bir xromosom saytından digərinə keçə bilən (transpozisiya edən) mobil DNT elementlərindən istifadə etməkiə yaradıla bilər. Fəsil 8-də daha ətraflı müzakirə olunduğu kimi, bu DNT ardıcıllıqları təbii olaraq orqanizmlərin çoxunun genomlarında yaranır və əgər onlar zülal-kodlaşdırıcı rayona keçirsə funksiyanın-itirilməsi mutasiyasının yaranmasına səbə olurlar.

Məsələn, tədqiqatçılar *Drosophila*-nın *P-element* kimi məlum olan mobil DNT elementini insersiya mutasiyanın eksperimental yaradılmasında istifadə edilməsini optimallaşdırmaq üçün onu modifikasiya etmişlər. **P** elementin daxil edilməsinin maraqlı fenotipi yaradan mutasiyaya səbəb olması nümayiş etdirildikdən sonra, daxil edilən insersiya saytına bitişik olan genom ardıcıllığı standart PZR protokolunun məlum P-element ardıcıllığına komplementar olan, amma məlum olmayan qonşu ardıcıllığı amplifikasiya etməyə imkan verən sintetik oliqonukleotid praymerlərdən istifadə edən variasiyaları ilə amplifikasiya oluna bilər. Şəkil 6-20-də verilmiş belə bir metod, P-element insersiyasına malik olan *Drosophila* genom DNT-sinin, P-element daxilində DNT-ni bir dəfə kəsə bilən restriksiya fermenti ilə kəsilməsiylə başlayır. Doğranmış DNT fraqmentlərinin toplusu DNT liqaza ilə reaksiyaya məruz qoyulduqda dairəvi molekulların yaranmasına səbəb olur və bu molekullardın bəziləri P-element DNT-sinə malik olur. P element cinahındakı xromosomal rayon sonra, P-element ardıcıllığına uyğun olan və əks istiqamətlərdə elonqasiya edən praymerlərdən istifadə edərək PZR ilə amplifikasiya oluna bilər. Nəticədə əmələ gələn amplifikasiya olmuş fraqmentin ardıcıllığı, sonra üçüncü DNT praymerdən istifadə etməklə təyin edilə bilir. P-elementin daxil edildiyi saytın təyin olunması üçün mühüm ardıcıllıq P-elementin ucu ilə genom ardıcıllıqları arasindakı qovşaqdır. Ümumiyyətlə, bu yanaşma, böyük sayda DNT fraqmentlərinin klonlaşdırılmasından və mutasiya olunmuş maraq geninə müvafiq olan klonlaşdırılmış DNT-ni təyin etmək üçün bu fraqmentlərin ekranlaşdırılmasından yan keçir.



ŞƏKİL 6-20 DNT transpozonun insersiya saytında genom ardıcıllığı PZR amplifikasiya və ardıcıllıq oxunması ilə aşkar edilmişdir. P-elementin insersiya saytının DNT ardıcıllığının əldə olunması üçün məlum olan transpozon ardıcıllığı ilə məlum olmayan cinah xromosomal ardıcıllıq arasındakı qovşağı PZR amplifikasiya etmək lazımdır. Buna nail olmaq üçün bir yol genom DNT-sini, onun transpozon ardıcıllığı rayonunda yalnız bir dəfə kəsə bilən restriksiya fermenti ilə doğramaqdır. Nəticədə əmələ gəlmiş restriksiya fraqmentlərinin liqasiyası dairəvi DNT molekullarını yaradacaq. Transpozon ardıcıllıqlarına uyğun gələn, müvafiq dizayn olunmuş DNT praymerlərdən istifadə edərək, arzu olunan qovşaq fraqmenti PZR amplifikasiya etmək olar. Nəhayət, DNT ardıcıllığının oxunması reaksiyası (bax Şəkil 6-21 və 6-22), templeyt kimi PZR ilə amplifikasiya olunmuş fraqmentdən və xromosomla transpozon arasındakı qovşağın ardıcıllığını əldə etmək üçün transpozonun sonluğuna yaxın ardıcıllığa uyğun gələn oliqonukleotid praymerdən istifadə etməklə həyata keçirilir.

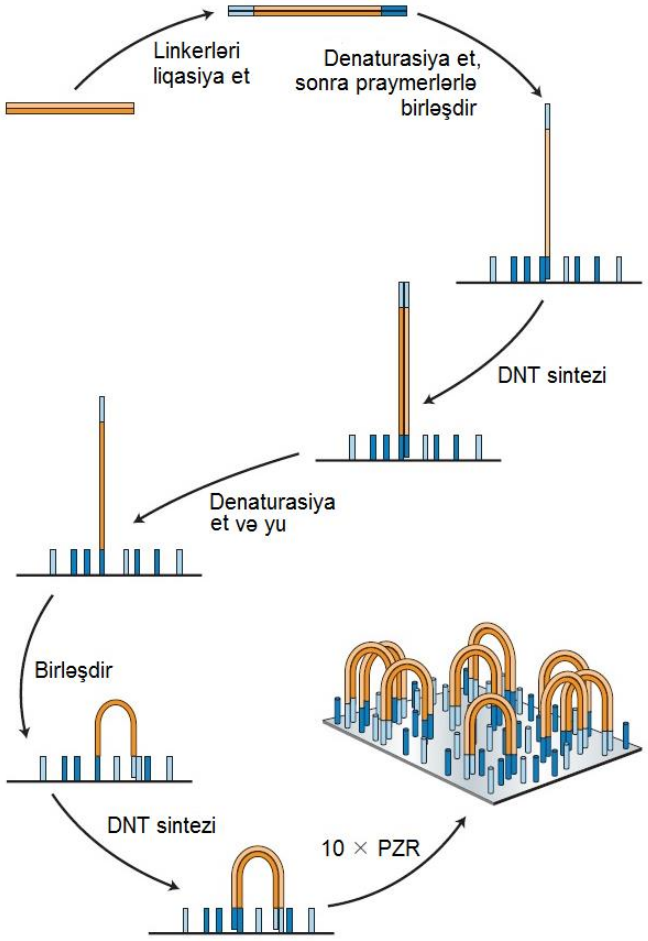
Oxşar metodlar, mobil DNT elementlərindən və ya genom ardıcıllıqları oxunmuş və genoma təsadüfi keçə bilən viruslardan istifadə etməklə insersiya mutasiyasının yaradıla biləcəyi başqa orqanizmlərdə də tətbiq olunmuşdur.

Klonlaşdırılmış DNT Molekullarının Ardıcıllığı PZR-ə Əsaslanan Metodlarla Tez Oxuna Bilər

İstənilən klonlaşdırılmış DNT fraqmentinin tam xarakterizə olunması onun nukleotid ardıcıllığının təyin olunmasını tələb edir. DNT seqmentinin ardıcıllığının təyin olunmasında istifadə olunan texnologiya molekulyar biologiyanın çox sürətlə inkişaf edən sahələrindən birini təmsil edir. 1970-ci illərdə F. Sanger və onun həmkarları zəncirin-terminasiyası prosedurunu yaradıb inkişaf etdirdilər, bu metod növbəti 30 il müddətində DNT ardıcıllığının oxunmasının əsasını təşkil etdi. Bu metodun əsas ideyası, ardıcıllığı oxunmalı olan DNT fraqmentindən, bir ucunda nişanlanmış və dörd nukleotiddən biri ilə terminasiya olunmuş qız zəncirlər dəstinin sintez edilməsidir. Xırdalanmaış qız zəncirlərinin uzunluğuna görə bir nukleotid fərqlənən zəncirləri bir-birindən ayırmağa imkan verən gel elektroforezi vasitəsi ilə ayırılması, sonra G, A, T və C ilə qurtaran bütün zəncirlərin uzunluğunu aşkar etməyə imkan verdi. Müxtəlif uzunluqlarda olan zəncirlərin bu toplusundan (kolleksiyasından) orjinal DNT fraqmentinin nukleotid ardıcıllığını müəyyən etmək oldu. Sanger metodunda müxtəlif təkmilləşdirmələr aparılmış və proses indi tam avtomatlaşdırılmışdır, amma hər bir yeni DNT ardıcıllığı ayrıca fərdi ardıcıllığın-oxunması reaksiyasını tələb etdiyindən bu metodla həyata keçirilən yeni DNT ardıcıllığının oxunmasının ümumi sürəti bir dəfəyə yerinə yetirilə bilən reaksiyaların ümumi sayı ilə məhdudlaşır.

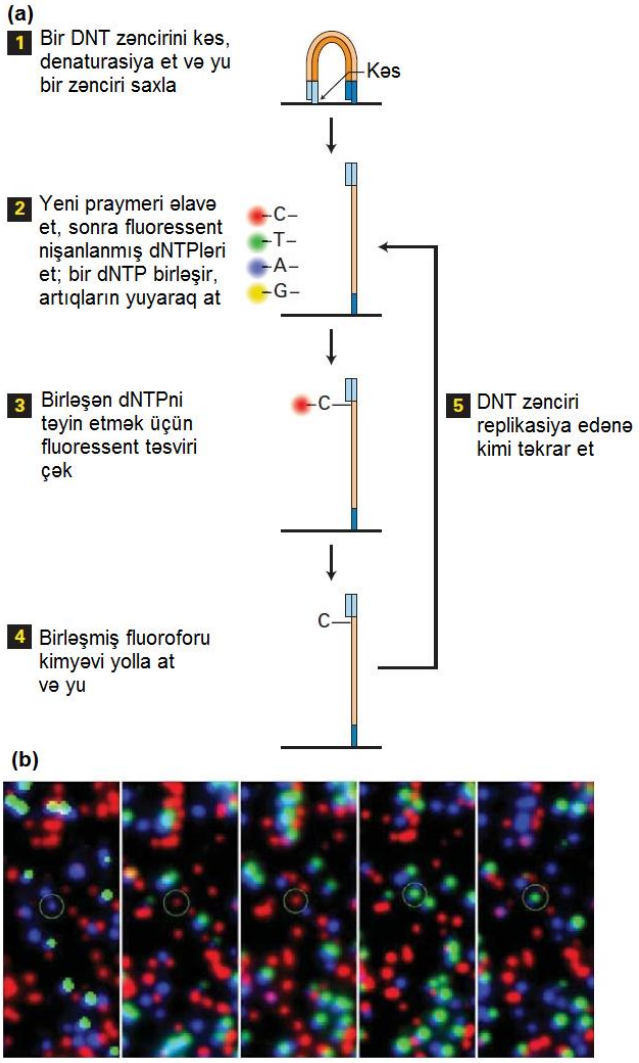
Ardıcıllığın oxunması texnologiyasında sıçrayış o zaman meydana gəldi ki, bərk substratın səthində kiçik bir klasterdə yerləşdirməklə milliardlarla sekvens reaksiyasını eyni zamanda bir sekvens cihazında həyata keçirmək metodları icad etdildi. 2007-ci ildən başlayaraq, ***növbəti-nəsil*** (***next-generation***) sekvenserlər əldə olunduqdan bəri, yeni sekvens məhsullarının həcmi həddən artıq böyüdü və o vaxtdan bəri demək olar ki hər il iki dəfə artır. Populyar sekvens metodunun birində, sekvens olunmaq üçün milliardlarla müxtəlif DNT zəncirləri, onların sonluğuna ikizəncirli linkeri liqasiya etməklə hazırlanır (Şəkil 6-21). Sonra DNT fraqmentləri, onların linker ardıcıllığına uyğun olan praymerlərdən istifadə etməklə PZR amplifikasiya olunur. Bu reaksiya Şəkil 6-19-da göstərilmiş standard PZR amplifikasiya reaksiyasından onunla fərqlənir ki, burada istifadə olunan praymer bərk substrata kovalent bərkidilir. Beləliklə, PZR amplifikasiya davam etdikcə hər bir qız DNT zəncirinin bir

ucu substrata kovalent bağlı olur və amplifikasiyanın sonunda ~1000 qədər eyni (identik) PZR məhsulu sıx klaster şəkilində səthə bağlı olur.



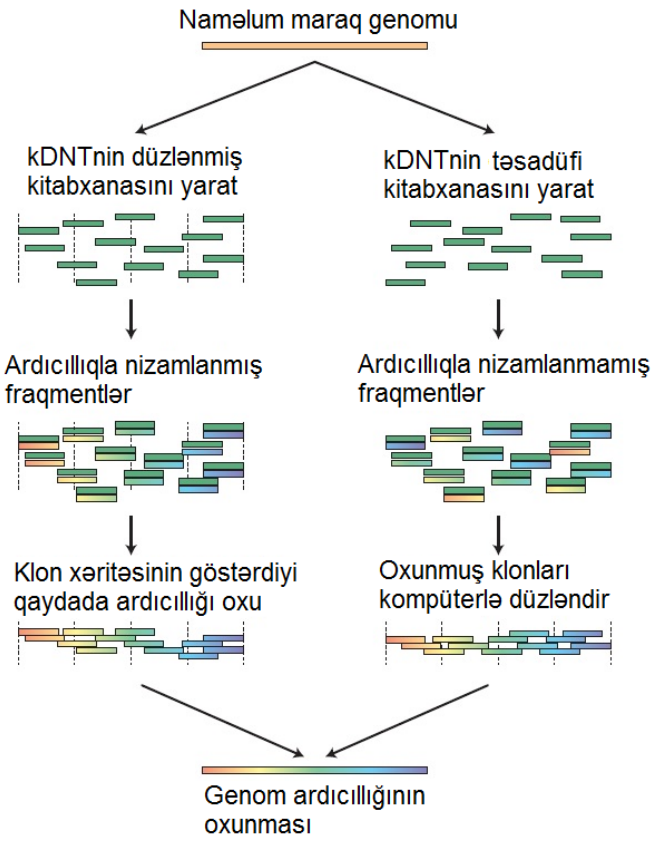
EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-21 Bərk səthə bərkidilmiş eyni DNT molekullarının klasterlərinin yaradılması. Ardıcıllığı oxunmaq üçün DNT fraqmentlərinin böyük bir toplusu, hər bir sonluğuna qoşulmaqla ikizəncirli linkerə liqasiya edilir. Sonra DNT, bərk səthə kovalent bərkidilmiş linkerlərin ardıcıllığına uyğun olan praymerlərlərdən istifadə etməklə PZR amplifikasiya olunur. On tsikldə aparılmış amplifikasiya, kiçik qrupda (klasterdə) yerləşmiş və bərk substratın hər iki ucuna qoıulmuş DNT fraqmentinin 1000-ə yaxın eyni nüxsəsini yaradır. Bu reaksiyalar, 3×10^9 qədər çoxlu miqdarda diskret, üst-üstə düşməyən, ardıcıllığı oxunmağa hazır olan klasterləri yaratmaq üçün optimallaşdırılırlar.

Bu klasterlər sonra, fluoressyent nişanlanmış deoksiribonukleotidlərin (dNTP-ləri) DNT polimeraza vasitəsi ilə uzunayan DNT zəncirinə hər dəfə birləşdikcə təsvirini çıxarmaq üçün xüsusi mikroskopdan istifadə edərək sekvens oluna bilir (Şəkil 6-22). Əvvəlcə, bir zəncir kəsilərək yuyulub çıxarılır və birzəncirli DNT templeyt qalır. Sonra ardıcıllığın oxunması qrupda olan təxminən min və ya daha çox eyni templeyt üzərində, hər dəfə bir nukleotid oxumaqla aparılır. Bütün dörd dNTP-lər fluoressent nişanlanaraq sekvens reaksiyasına əlavə edilir. Onlar reaksiyaya daxil olduqdan sonra, substrat mikroskopla təsvir edilir və hər bir klasterin rəngi yazılır (köçürülür). Sonra fluoressyent yarlıq kimyəvi yolla atılır və yeni dNTP-lərin birləşməsinə imkan yaradılır. Bu tsikl təxminən yüz dəfə təkrar olunur, nəticədə yüz-nukleotid-uzunluqda milliardlarla ardıcıllıq alınır. Bütün proses təxminən bir gün çekə bilir və təxminən 10^{11} əsas ardıcıllıqda məlumat əldə edilir.



EKSPERIMENTAL ŞƏKİL 6-22 Ardıcıllığın təyin edilməsində fluoressent nişanlanmış deoksiribonukleotid trifosfatların istifadə olunması. (a) Reaksiya, kluster olunmuş DNT-nin bir zəncirini kəsməklə başlayır (bax Şəkil 6-21). Denaturasiya etdikdən sonra tək DNT zənciri substrata yapışmış vəziyyətdə qalır. Müxtəlif rənglərdə fluoressyent nişanlanmış dNTP-lərə malik olan sintetik oliqodeoksinukleotid polimeriləşmə reaksiyası üçün praymer kimi istifadə olunur. Fluoressyent nişanlama, dNTP-lərdə 3′ OH qrupuna mane olmaq üçün tərtib olunmuşdur, belə ki, fluoressent dNTP birləşdikdən sonra zəncirin elonqasiyası daha davam edə bilmir. DNT polimeraza eyni fluoressent dNTP-ləri klasterdə olan mindən artıq DNT nüsxəsinin hər birinə birləşdirdiyindən və bütün klaster eyni fluoressent rənglə bir formada nişanlandığından xüsusi fluoressent mikroskop altında onun şəklini çəkmək olur. (b) Eyni görünüş sahəsindən olan beş təsvirin hər biri dNTP əlavə edilməsinin fərdi tsikllərinə uyğun gəlir. Hər bir təsvir çəkildikdən sonra fluoressyent yarlıq kimyəvi reaksiya yolu ilə atılır və beləliklə, fluoressyent nişanlanmış dNTP-lərin əlavə olunmasının növbəti tsikli üçün yeni praymer terminalı hazır olur.

Dairələnmiş rəngli nöqtələrdən göründüyü kimi, hər bir reaksiya tsiklindəki rəng dəyişməsi nukleotidlərin DNT fraqmentinə əlavə edilməsinə uyğundur. Tipik sekvens reaksiyası, hər bir klaster üçün ardıcıllığın 100 əsasını təyin etməyə imkan verən 100 polimerıəşmə tsiklini həyata keçirə bilir. Beləliklə, bu tipli yekun sekvens reaksiyası iki günə qədər müddətdə 3×10^{11} əsasa qədər çoxsaylı ardıcıllıq məlumatlarını əldə edə bilir. [(b) hissəsi A. Loehr and A.W. Zaranek for the Harvard Personal Genom Project.]



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-23 Tam genom ardıcıllığının toplanmasının iki strategiyası. Metodlardan biri (*solda*), genomu əhatə edən klonlaşdırılmış DNT seqmentləri dəstinin ayrılmasından və toplanmasından asılıdır. Bu, klonlaşdırılmış seqmentlərin hibridləşmə və ya restriksiya-saytları xəritələrinin düzlənməsinə uyğun gəlməsi ilə edilə bilər. Sıralanmış klonlarda DNT ardıcıllığı sonra tam genom ardıcıllığında toplana bilər. Alternativ metod (*sağda*), avtomatlaşmış DNT sekvensinin nisbi rahatlığından asılıdır və kitabxananın qurulmasında zəhmət tələb edən çətinliklərdən yan keçir. Kitabxanadan, genomun hər bir seqmentinin 3 - 10 dəfə təmsil olunması ilə kifayət qədər təsadüfi klonları sekvens etməklə, genom ardıcıllığını çox böyük sayda ardıcıllıq fraqmentlərinin computer düzləndirilməsi yolu ilə yenidən qurmaq olar.

Genom DNT-nin uzun fasiləsiz davam edən rayonunu və ya orqanizmin verilmiş tam genomunu oxumaq üçün adətən tədqiqatçılar Şəkil 6-23-də təsvir olunmuş strategiyadan birini tətbiq edirlər. Birinci metod, ardıcıllıqları üst-üstə düşən, klonlaşdırılmış DNT fraqmentlərinin toplusunun ayırılmasını tələb edir. Bu fraqmentlərdən birinin ardıcıllığı təyin edildikdən sonra, bu ardıcıllığa əsaslanan oliqonukleotidlər kimyəvi yolla sintez olunaraq ona birləşmiş üst-üstə düşən ardıcıllıqların oxunmasında praymer kimi istifadə oluna bilir. Beləliklə, DNT-nin uzunamış böyük hssəsinin ardıcıllığı, onun tərkib hissəsi olan, üst-üstə düşən klonlaşdırılmış DNT fraqmentlərinin ardıcıllığının tədricən artan oxunması ilə təyin olunur. ***Tam genom şotqan sekvensi*** (***whole genome shotgun secuencing***) kimi adlandırılan ikinci metod, genomu əhatə edən DNT seqmentlərinin sıralanmış kolleksiyasının ayrılması kimi vaxt aparan mərhələdən yan keçir. Bu metoda, genom kitabxanası sıralarından təsadüfi klonların ardıcıllığının sadə oxunması daxildir. Sekvens üçün klonların kifayət edən sayı elə seçilir ki, genomun hər bir seqmentinin ardıcıllığı orta hesabla 10 dəfə oxunur. Bu əhatə dərəcəsi əmin edir ki, genomun hər bir seqmentinin ardıcıllığı bir dəfədən artıq oxunmuş olsun. Sonra, tam genom ardıcıllığı kompüter alqoritmdən istifadə edərək toplanır, bütün ardıcıllıqlar onların üst-üstə düşən rayonlarından istifadə edərək düzləndirilir. Tam genom şotqan sekvensi, uzun DNT rayonlarının ardıcıllığının oxunmasında ən sürətl və maaliyyə cəhətdən ən səmərəli metoddur, və genomların çoxunun ardıcıllığı, o cumlədən insan genomunun ardıcıllığı bu yolla oxunmuşdur.

5.2 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSIYALARI

DNT-nin Klonlaşdırılması və Xarakteristikasii

- DNT-nin klonlaşdırılması zamanı rekombinant DNT molekulları, DNT fraqmentlərini vektor DNT molekullarına keçirməklə *in vitro* yaranır. Sonra rekombinant DNT molekulları sahib hüceyrə daxilinə keçirilir, burada onlar replikasiya edərək böyük sayda rekombinant DNT molekullarını yaradırlar.
- Restriksiya fermentləri (endonukleazalar) adətən DNT-ni spesifik 4-dən 8-ə qədər əsas cütlü palindrom ardıcıllıqda kəsərək, çox hallarda özü-özünə komplementar olan bir zəncirli quyruğa (yapışqan ucluqlara) malik olan müəyyən fraqmentləri yaradırlar.
- Komplementar sonluqlu iki restriksiya fraqmenti, rekombinant DNT molekulunu yaratmaq üçün DNT liqaza ilə birləşdirilə bilər (bax Şəkil 6-12).
- *E. coli*-nin klonlaşdırma vektorları kiçik həlqəvi DNT molekulları (plazmidlər) olub üç funksional rayona malikdirlər: replikasiya mənşəyi (origin), seçilə-bilən marker geni, və DNT fraqmentlərinin daxil edilə biləcəyi sayt. Vektoru daşıyan transformasiya olunmuş hüceyrələr seçmə mühütində bitərək koloniyaları əmələ gətirirlər (bax Şəkil 6-14).
- Genom kitabxanası, tam genomun doğranması ilə hazırlanan restriksiya fraqmentlərini daşıyan klonlar dəstidir.
- Həm maya göbələyində həm də *E. coli*-də replikasiya edə bilən şatl vektorlar maya göbələyi genom kitabxanasının yaradılmasında istifadə oluna bilər. Xüsusi genlər, maya göbələyində uyğun olan mutant genlərə olan komplementarlıq qabliyyətinə görə ayrıla bilərlər (bax Şəkil 6-16).
- kDNT klonlaşdırılmasında, ekspressiya olunan mRNT-lər geriyə-transkripsiya olunaraq komplementar DNT-ləri və ya kDNT-ləri yaradırlar. kDNT kitabxanası, xüsusi hüceyrə və ya toxuma tipindən ayrılmış mRNT-dən hazırlanan kDNT klonlarının dəstindən ibarətdir (bax Şəkil 6-17).
- Əgər amplifikasiya olunan DNT rayonuna cinah ardıcıllıq məlumdırsa polimeraza zəncirvari reaksiya (PZR), xüsusi

DNT seqmentinin vahid bir DNT molekulundan ilkin templeyt kimi həndəsi silsilədə amplifikasiyasına imkan verir (bax Şəkil 6-19).

- PZR yüksək dərəcədə hərtərəfli inkişaf etmiş metod olub xüsusi genom DNT ardıcıllığını, kDNT-ni və ya transpozon elementləri ilə cinah xromosom qovşağındakı ardıcıllıqları amplifikasiya etmək üçün proqramlaşdırıla bilər.
- 100 nukleotidə qədər uzunluqda olan DNT fraqmentləri, PZR ilə oxşar molekulların klasterlərini yaratmaqla və DNT polimeraza ilə birləşdirilən fluoressyent nişanlanmış nukleotid sələfləri təsvir etməklə sekvens olunurlar (bax Şəkil 6-21 və 6-22).
- Tam genom ardıcıllığı, genom kitabxanasında olan böyük miqdarda üst-üstə düşən klonların ardıcıllıqlığından yaradıla bilər (bax Şəkil 6-23).

6.3 Genlərin Ekspressiyasının Öyrənilməsində Klonlaşdırılmış DNT Fraqmentinin İstifadə Olunması

Sonuncu bölmədə, biz xüsusi DNT klonlarını ayırmaq üçün, recombinant DNT texnologiyasının istifadə olunmasının əsas metodlarını və klonların sonrakı öyrənilməsi yollarını təsvir etdik. Burada biz, ayrılmış DNT klonlarının genlərin ekspressiyasının öyrənilməsində necə istifadə oluna biləcəyi yollarını müzakirə edəcəyik. Biz, genlərin nə vaxt və harada ekspressiya olunduğunu öyrənmək üçün nuklein turşularının hibridləşməsinə əsaslanan bir neçə geniş istifadə olunan ümumi metodları, həmçinin, zülalların böyük miqdarda əldə (istehsal) olunması metodlarını, onların ekspressiya olunma profilini, quruluşunu və fəaliyyətini, funksiyasını təyin etmək üçün aminturşu ardıcıllığı üzərində aparılan manipulyasiyaları müzakirə edirik. Bu cürə ümumi metodların daha spesifik tətbiq sahələri növbəti bölmələrdə öyrənilir.

Hibridləşmə Metodları Spesifik DNT Fraqmentlərinin və mRNT-lərin Təyin Olunmasına İmkan Verir

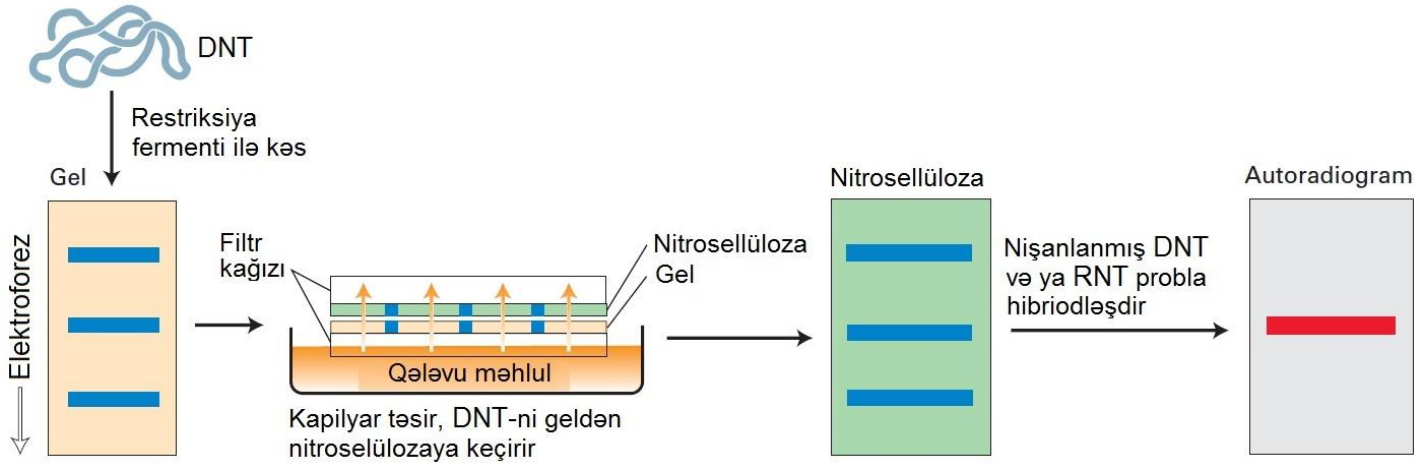
Hibridləşmə birzəncirli komplementar DNT və ya RNT molekullarının spesifik olaraq əsas cütü əmələ gətirməklə assosasiya etmə (hibridləşmə) qabliyyətindən asılıdır. Fəsil 4-də müzakirə olunduğu kimi, iki-zəncirli (dupleks) DNT durulaşdırılmış məhlulda qızdırılmaqla tək zəncirlərə denaturasiya oluna bilir. Əgər, sonra temperatur aşağı enərsə və ion qatılığı qalxarsa komplementar tək zəncirlər yenidən duplekslərdə assosasiya edəcəklər (hibridləşəcəklər). Nuklein turşularının qatışığında yalnız komplementar tək zəncirlər (və ya komplementar rayonlara malik olan zəncirlər) yenidən assosasiya edəcəklər, bundan başqa onların yenidən assosasiya etmə dərəcəsinə qeyri-komplementar zəncirlərin mövcud olması virtual olaraq təsir etməyəcək.

Kompleks qatışıqda xüsusi DNT və ya RNT ardıcıllıqlarının təyin edilməsi iki çox həssas metodu, gel elektroforezlə ayrılmanı və radioaktiv və ya fluoressyent nişanlanmış komplementar DNT probları ilə hibridləşməni birləşdirir. Üçüncü metod nişanlanmış probların hazırlanmış toxuma nümunələrinə birbaşa hibridləşdirilməsini əhatə edir. Biz, bu metodların hər üçünə aid istinadlarla qarşılaşacağıq və onların çoxsaylı istifadə nümunələri başqa fəsillərdə də verilir.

Sauzerin Blottinq DNT fraqmentlərinin xüsusi ardıcıllıqlarını təyin etmək üçün ilk istifadə olunan hibridləşmə metodu onun yaradıcısı E.M. Southernin şərəfinə adlandırılan **Sauzern blottinq** metodudur. Bu metod, tam insan genomunun restriksiya fermenti ilə doğranmasından alınan, fraqmentlərin çox mürəkkəb qatışığında tək bir spesifik restriksiya fraqmentini təyin etməyə imkan verir. Müxtəlif ölçülərdə olan DNT fraqmentlərini ayıran geniş yayılmış prosedur *gel elektroforezidir*. Neytral pH yaxınlığında DNT molekulları böyük mənfi yükü daşıyırlar və ona görə də gel elektroforez zamanı müsbət yüklü elektroda doğru hərəkət edirlər. Gel matrisası molekullarının təsadüfi diffuziyasını məhdudlaşdırdığından, eyni uzunluqlu molekullar fərqli bəndlər kimi birlikdə miqrasiya edirlər. Kiçik molekullar bütün gel matrisasını daha asanlıqla keçərək böyük molekullara nisbətən tez hərəkət edirlər. Təxminən 200 əsas cütündən 20 kə qədər ölçülü daha böyük molekullar ***aqaroza gelində*** ayrılırlar, təxminən 10 - 2000 nukleotid uzunluqda olan kiçik DNT molekulları isə ***poliakrilamid gelində*** elektrofoerz yolu ilə ayrıla bilərlər.

Bütöv genom DNT-si restriksiya fermenti ilə doğranmaqla fraqmentlərə ayrıldıqda DNT fraqmentlərinin belə mürəkkəb qatışığı hətta gel elektroforezinə məruz qoyulduqda belə, təxminən eyni uzunluqda çoxlu miqdarda müxtəlif fraqmentlər bir yerdə ayrılır və xüsusi DNT fraqmentini gel üzərində olan diskret bənd kimi ayırmaq mümkün olmur. Bununla belə, geldə bənd şəkilində miqrasiya edən xüsusi fraqmenti onun spesifik DNT proba hibridləşmək qabliyyətinə görə təyin etmək mümkündür. Bunu həyata keçirmək üçün, gel üzərində olan restriksiya fraqmentləri qələvi ilə denaturasiya olunur və blottinq yolu ilə nitroselluloza filtri və ya neylon membran üzərinə keçirilir (Şəkil 6-24). Bu əməliyyat fraqmentlərin geldə paylanmasını saxlayır və membrana miqrasiya edərək filtr üzərində gelin tam oxşarını yaradır. (Ona görə blottinqdan istifadə olunur ki, problar orjinal gelə çətinliklə diffuziya edirlər.) Sonra filtr hibridləşdirmə şəraitində, adətən klonlaşdırılmış restriksiya fraqmentlərindən yaradılan nişanlanmış xüsusi DNT problarla inkubasiya edilərək hibridləşdirilir. Proba komplementar olan DNT restriksiya fraqmenti ona hibridləşir və onun filtr üzərində yeri avtoradioqrafiya yolu ilə (radioaktiv nişanlanmış problar üçün) və ya fluoressyent təsvirlə (fluoressent nişanlanmış problar üçün) təyin edilir. Baxmayaraq ki, xüsusi ardıcıpllığın verilmiş mürəkkəb qatışıqda mövcud olmasını təyin etmək üçün PZR daha çox istifadə olunan metoddur, Sauzerin blottinq hələ də, bir reaksiyada PZR amplifikasiya etmək üçün bir-birindən çox aralı (uzaqda) yerləşən genom ardıcıllıq1arı arasındakı əlaqənin öyrənilməsi üçün istifadə olunur.

Norzerin Blottinq Klonlaşdırılmış genin xarakterizə olıunmasının əsas yollarından biri bu genin orqanizmdə nə vaxt və harada ekspressiya olunduğunu təyin etməkdir. Xüsusi bir genin ekspressiyası uyğun mRNT-nin ekspressiyasının, Sauzerin blottinqə yaxın olan metod kimi, müvafiq olaraq **Norzerin blotting** adlandırılan metodun tətbiqi ilə izlənilə bilər. RNT nümunəsi, çox hallarda ümumi (total) hüceyrə RNT-si, əsas cütləri arasındakı hidrogen əlaqələrini qıran formaldehid kimi agentlərlə denaturasiya olunaraq bütün RNT



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-24 Sauzerin blottinq restriksiya fraqmentlərinin mürəkkəb qatışığında spesifik DNT fraqmentini təyin edə bilir. Diaqram, geldə üç müxtəlif restriksiya fraqmentini göstərir, amma bu proses milllionlarla DNT fraqmentlərinin iştirak etdiyi qatışığa da tətbiq oluna bilər. Yalnız radionişanlanmış problarla hibridləşən fraqmentlər avtoradioqramda siqnal verəcək. Norzerin blottinq adlandırılan buna bənzər metod qatışıqda olan xüsusi mRNT-ləri təyin etməyə imkan verir. Bax, E.M. Southern, 1975, *J.Mol.Biol.* **98**:508.

molekullarının bükümü açılir və onların xətti konformasiyanı alması təmin edilir. Fərdi RNT-lər gel elektroforezində ölçülərinə uyğun olaraq ayrılaraq nitraselluloza filtrinə keçirilirlər və denaturasiya olunmuş RNT-lər filtrə yapışırlar. Sonra Saouzern blottinqdə olduğu kimi, filtr maraq geninə komplementar olan radionişanlanmış problarla inkubasiya olunur, nəhayət sonda nişanlanmış filtr avtoradioqrafiya olunur. Nümunədəki spesifik RNT-nin miqdarı Norzern blottinqdə hesablana bildiyindən, bu proses, müxtəlif şərait altında hüceyrədə xüsusi mRNT-lərin miqdarının müqayisəsində geniş istifadə olunur.

İn Situ Hibridləşməsi Norzerin blottinq mRNT-ni hüceyrədən və ya hüceyrələr qatışığından ayırmağı tələb edir, yəni bu onu göstərir ki, hüceyrə onun orqanizmdə və ya toxumada normal yerləşdiyi yerdən ayrılır. Nəticədə, hüceyrədə yerləşmə mvqeyi və onun qonşuluqda olanlarla qarşılıqlı münasibəti itirilir. Genlərin ekspressiyasının dəqiq tədqiqatları zamanı bu cürə yerləşmə informasiyalarının qorunub saxlanması üçün bütöv toxuma və ya toxuma kəsikləri, və ya hətta keçiriciliyi təmin olunan embrion, xüsusi genlərin kodlaşdırdığı mRNT-lərin təyini üçün **in situ hibridləşməsində** istifadə oluna bilər. Bu metod, zaman və məkan daxilində genin ekspressiyasının təyininə imkan verir (Şəkil 6-25).

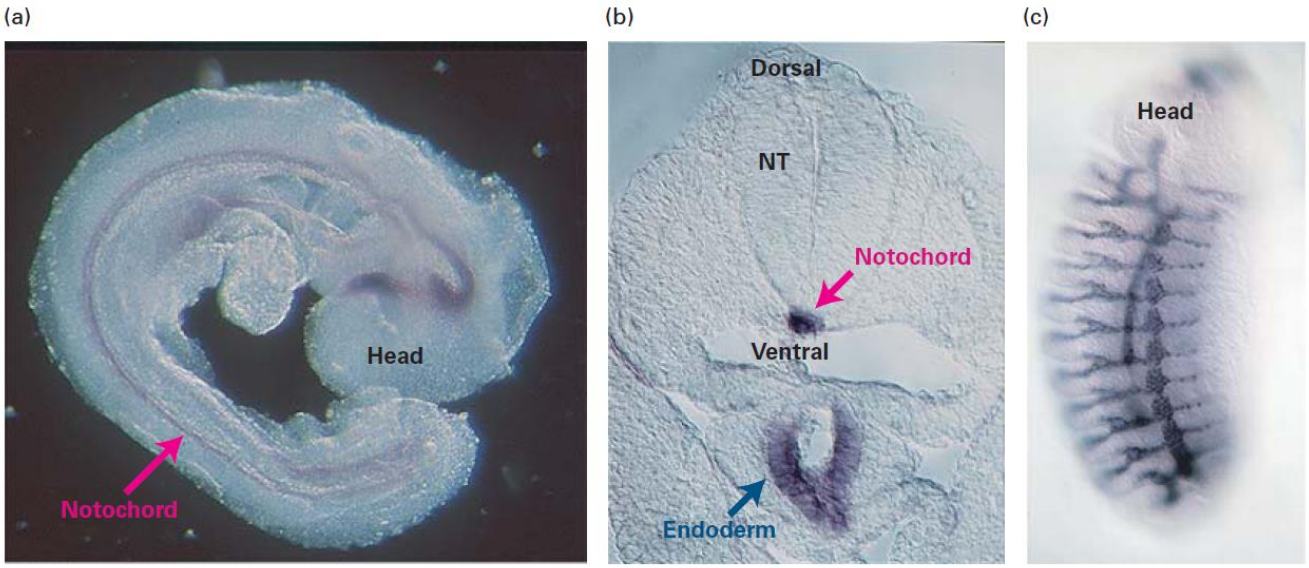
DNT Mikroarrey Çox Genlərin Ekspressiyasının Bir Dəfəyə Qiymətləndirilməsində Istifadə Oluna Bilər

Eyni zamanda minlərlə genin ekspressiyasının monitorinqi, nuklein turşularının hibridləşməsi konsepsiyasına əsaslanan başqa bir metodla, **DNT mikroarrey** metodu ilə mümkündür. DNT mikroarrey mikroskop şüşələrinin səthinə yapışdırılmış minlərlə fərdi, sıx şəkildə yaxın yerləşdirilmiş gen-spesifik ardıcıllıqların qurulmuş cərgələrindən təşkil olunmuşdur. Mikroarrey analizlərini genom ardıcıllığının oxunması layihələrinin nəticələri ilə birləşdirməklə, tədqiqatçılar orqanizmlərin inkişaf prosesində və ya fizioloji cavab reaksiyaları zamanı gen ekspressiyasının qlobal profilini analiz edə bilirlər.

DNT Mikroarreyin Hazırlanması Mikroarreyin hazırlanmasının bir metodunda, hər bir analiz olunan genin təxminən ~1-kə kodlaşdırıcı rayonu fərdi olaraq PZR ilə amplifikasiya olunur. Robot alətindən istifadə olunaraq hər bir amplifikasiya olunmuş DNT nümunəsi şüşə mikroskop lövhələrinin səthinə köçürülür, sonra isə DNT ardıcıllıqlarını şüşə lövhənin səthinə daimi yapışdırmaq və onları denaturasiya etmək üçün kimyəvi təsirə məruz qoyulur. Tipik arrey, 2×2-sm ölçülü şüşə lövhədə təxminən ~6000 DNT ləkələrinə malik ola bilir.

Alternativ metodda, adətən ən azı 20 nukleotid uzunluqda olan çoxsaylı DNT oliqonukleotidləri, şüşə mikroskop lövhəsinin səthinə kovalent birləşmiş ilkin nukleotiddən sintez olunmağa başlayır. Xüsusi ardıcıllığın oliqonukleotidinin sintezi şüşə lövhənin səthinin kiçik bir rayonunda proqramlaşdırıla bilir. Beləliklə, bir gendən bir neçə oliqonukleotid ardıcıllığı, həmin genin ekspressiyasını analiz etmək üçün şüşə lövhənin yaxın qonşu rayonlarında sintez olunur. Bu metodla, minlərlə geni təmsil edən oliqonukleotidlər bir şüşə lövhə üzərində yaradıla bilir. Çünki sintetik oliqonukleotidlərin bu arreyini yaratmaq üçün istifadə olunan metodlar, kompüterlərdə istifadə olunan mikroskopik inteqrasiya olunmuş sxemlərin istehsal metodlarından adaptasiya edilmişlər, bu tipli oliqonukleotid mikroarreylər çox hallarda ***DNT çiplər*** adlandırılır.

Müxtəlif Şəraitlərdə Gen Ekspressiyasının Müqayisəsində Mikroarreydən İstifadə Edilməsi Mikroarrey ekspressiya tədqiqatları zamanı ilkin pillə, tədqiqat hüceyrələrində ekspressiya olunan mRNT-lərə uyğun olan flouresent nişanlanmış kDNT-ləri hazırlamaqdır. kDNT preparatları mikroarreyə tətbiq olunanda, ləkələrin göstərdiyi ekspressiya olunan genlər müəyyən şərait altında nişanlanmış



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-25 İn situ hibridləşmə bütöv və kəsiklərə ayrılmış embrionda xüsusi genlərin fəallığını aşkar edə bilir. mRNT-nin problara məruz qala bilməsi üçün nümunə detergent və proteaza ilə emal olunaraq onun keçiriciliyi artırılmışdır. Maraq mRNT-yə spesifik olan DNT və ya RNT prob anticismlərlə tanına bilən kimyəvi qruplara malik olan nukleotid analoqlardan düzəldilmişdir. Keçiriciliyi artırılmış nümunə hibridləşməni artıran şəraitdə problarla inkubasiya olunduqdan sonra problarn artıq qalan hissəsi bir-neçə dəfə yumaqla uzaqlaşdırıldı. Sonra nümunə tərkibində problara birləşmək üçün anticism olan məhlulda inkubasiya olundu. Bu anticism kovalent əlaqə ilə, rənglənmiş reaksiya məhsulu verən reportyor fermentə bağlıdır (məsələn, qıtığotu peroksidaza və ya qələvi fosfataza). Anticismin artıq qalan hissəsi uzaqlaşdırıldıqdan sonra, reportyor fermentin substratı əlavə olunur. Probun mRNT-yə hibridləşdiyi yerdə rənglənmiş çöküntü formalaşaraq mRNT-ni aşkar edir. (a) Təxminən 10 günlük inkişaf dövründə olan tam siçan embriyonu üçün prob kimi *Sonik hechoq mRNT* istifadə olunmuşdur. Rənglənmiş nişanlar xordada (qırmızı ox), mezodermanın gələcək onurğa beyni boyunca uzunamış qişalı çıxıntılarında qeyd olunur. (b) Siçan embriyonunun kəsikləri (a) hissəsindəkinə oxşardır. Sinir borusunun (SB) ön/arxa oxu görünür, ondan aşağıda *Sonik hechoq* – ekspressiya edən xorda (qırmışı ox) və endodermanın (göy ox) uzaq döş nahiyəsi görünür. (c) Traxeyanın inkişafı dövründəki mRNT probla *Drosophila*-nın tam embriyonu. Bədən seqmqntlərinin təkrarlanan profili görünür. Ön (baş) yuxarıyadır, döş nahiyəsi sol tərəfədir. [Ljiljana Milenkovic and Matthew P. Scott.]

probların qatışığında öz komplementarı olan kDNT-lərə hibridləşəcək və uyğun olaraq skanerli lazer mikroskopunda aşkarlanacaq.

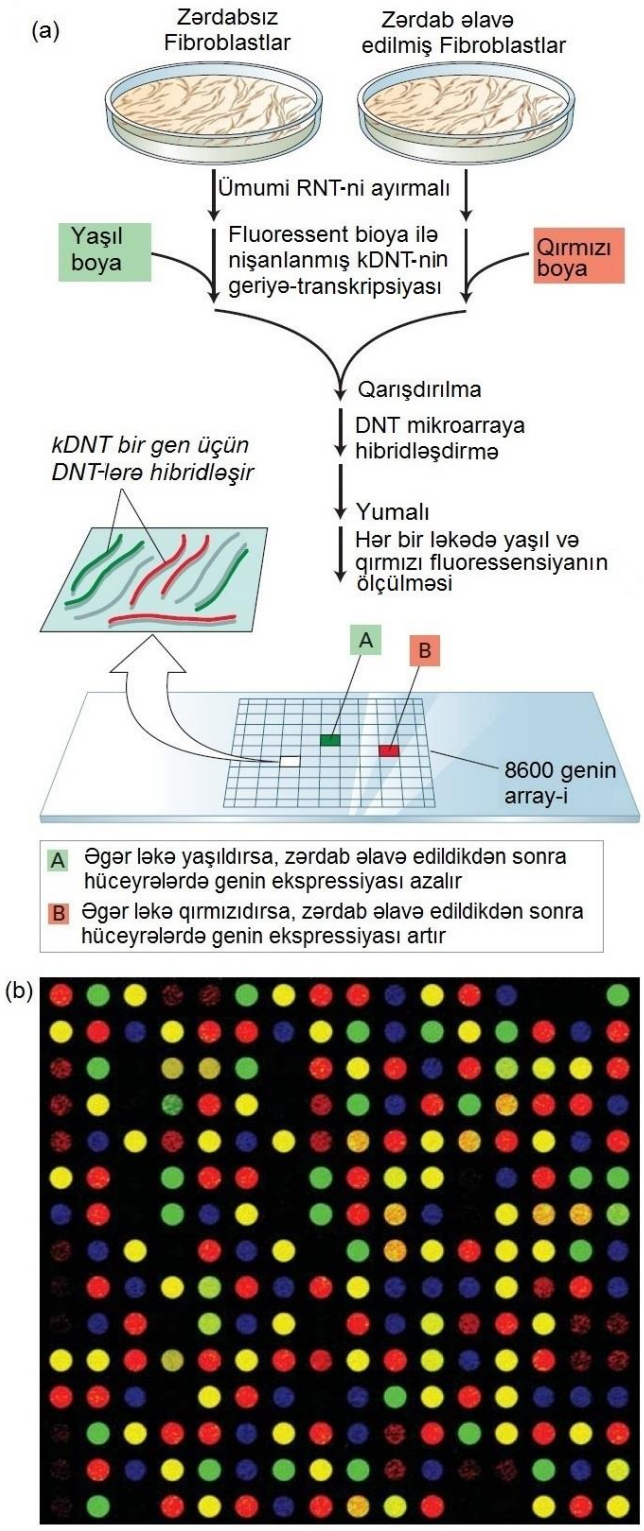
Şəkil 6-26 bu metodun insan fibroblastlarının aclıqdan sonra zəngin, zərdaba-malik olan böyümə mühütinə keçirildiyi zaman genlərin ekspressiyasındakı müşahidə olunan dəyişiklikləri öyrənmək üçün tətbiq olunduğunu göstərir. Bu tip eksperimentdə, aclığa məruz qoyulmuş və zərdab-mühütində bitən fibroblastlardan alınmış ayrıca kDNT preparatları müxtəlif rəngli fluoresyent boyalarla nişanlanmışdır. Məməlilərin 8600 gendən ibarət olan DNT arrey sonra, bərabər miqdarda iki kDNT preparatının qatışığından ibarət olan mühitdə hibridləşmə şəraiti altında inkubasiya olunmuşdur. Hibridləşməyən kDNT-lər yuyularaq uzaqlaşdırıldıqdan sonra, fluoressent mikroskopdan istifadə olunaraq hər bir DNT ləkəsində yaşıl və qırmızı fluoresensiyanın intensivliyi ölçüldü və hər bir genin adı altında onların lövhədəki məlum olan mövqeyinə uyğun olaraq kompüter fayllarında saxlanıldı. Hər bir ləkədə qırmızı və yaşıl fluoresyensiya siqnallarının nisbi intensivliyi o genin zərdaba cavab olaraq ekspressiyasının nisbi səviyyəsini göstərir. Bu böyümə şəraitində transkripsiya olunmayan genlər aşkar oluna bilən siqnal vermirlər. Hər iki şəraitdə eyni dərəcədə transkripsiya olunan genlər bərabər səviyyədə həm yaşıl həm də qırmızı fluoresyent nişanlanmış kDNT preparatları ilə hibridləşirlər. Fibroblastlarda genlərin ekspressiyasının mikroarrey analizi göstərdi ki, tədqiq olunmuş 8600 gendən təxminən 500-nin transkripsiyası mühitə zərdab əlavə olunduqdan sonra əsaslı şəkildə dəyişmişdir.

Çoxsaylı Ekspressiya Eksperimentlərindəki Klaster Analizləri Ko-tənzimlənən Genləri Müəyyən Edir

Nadir hallarda tək bir microarray eksperimentin nəticəsindən qətiyyətlə qənaətə gəlmək olar ki, ekspressiya zamanı oxşar dəyişiklik göstərən genlər ko-tənzimlənəndirlər və buna görə də, onlar funksiyalarına görə yaxın genlərdir. Məsələn, yuxarıda fibroblastlarda təsvir olunan gen ekpressiyasında müşahidə olunan dəyişikliklər hüceyrəni bir qida mühitindən başqasına keçirən zaman hüceyrə fiziologiyasında baş verən bir çox müxtəlif dəyişikliklərin dolayı nəticələri ola bilər. Başqa sözlə, tək bir mikroarrey ekspressiya eksperimentləri zamanı ko-tənzimlənən genlər müxtəlif səbəblərdən baş verən ekspressiya zamanı cox fərqli dəyişikliyə məruz qala bilərlər və ola bilsin ki, həqiqətən də müxtəlif bioloji funksiyaya malik olurlar. Bu problemin həlli, müxtəlif şəraitlərdə və ya zaman gedişində oxşar şəkildə tənzimlənən genləri tapmaq üçün exspressiya eksperimentlərindən alınan informasiyanı birləşdirməkdir.

Müxtəluf mikroarrey ekspressiya eksperimentlərinin daha informativ istifadəsi, yuxarıda qeyd olunduğu kimi, fibroblastlara zərdab əlavə olunduqdan sonra müxtəlif vaxtlarda 8600 genin nisbi ekspressiyasını yoxlamaqla və verilənlərin 10^4-dən artıq fərdi hissələrini yaratmaqla təsvir olunur. Müxtəlif

zülal ardıcıllıqlarının yaxınlığını təyin etmək üçün istifadə olunan kompüter proqramları, zərdab əlavə olunduqdan sonrakı vaxt ərzində, oxşar ekspressiyanı göstərən bu gen klasterlərini və verilənlər bazasını yarada bilər. Son dərəcə maraqlıdır ki, bu cürə ***klastr analizləri***, xolesterin biosintezi və ya hüceyrə tsikli kimi ümumi hüceyrə proseslərində iştirak edən zülalları kodlaşdıran genlər dəstini qruplaşdırır (Şəkil 6-27).



Mikroarrey analizləri təbabətdə çox güclü diaqnistika alətidir. Məsələn, zəif proqnozlu şişləri yaxşı proqnozu şişlərdən fərqləndirmək üçün mRNT-lərin xüsusi dəsti tapılmışdır. Əvvəllər fərqləndirilə bilməyən xəstəlik variasiyaları indi aşkar olunabiləndir. Fərqləndirilən bu mRNT-lərin şiş biopsiyalarının analizi həkimlərə daha çox uyğun olan müalicəni seçməyə kömək edəcək. Gen ekspressiyasının müxtəlif xəstə toxumaları üçün xarakterik olan daha çox profili aşkar olunduqca, diaqnostikada DNT mikroarreyin istifadəsi başqa şəraitlərə də şamil olunacq.

EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-26 DNT mikroarrey analizləri müxtəlif eksperimental şəraitlərdə fibroblastlarda gen ekspressiyasındakı fərqləri aşkar edir. (a) Bu nümunədə kDNT, zərdab aclığına məruz qoyulmuş və ya zərdab əlavə olunduqdan sonrakı fibroblastdan ayrılan mRNT-dən hazırlanmışdır və müxtəlif fluoresyent boyalarla rənglənmişdir. Məməlilərin 8600 genindən ibarət olan DNT ləkələrindən təşkil olunmuş mikroarrey hibridləşmə şəraiti altında iki kDNT preparatının qatışığına məruz qoyulmuşdur. Hər bir ləkə üçün yaşıl və qırmızı fluoresyent rənglərin intensivliyinin skanerli konfokal lazer mikroskopla aşkar olunmuş nisbəti, zərdaba cavab kimi hər bir genin nisbi ekspressiyasını göstərir. (b) Real DNT mikroarreyinin kiçik seqmentinin mikrofotosu. Bu 16×16 sırada olan hər bir ləkə, yaşıl və qırmızı fluoresyent boyalarla nişanlanmış, eksperimental və nəzarət kDNT nümunələrinə hibridləşən müxtəlif genlərin DNT-nə malikdir. (Sarı ləkə qırmızı və yaşıl fluoresyensiyanın bərabər hibridləşməsini göstərir və bu göstərir ki, genlərin ekspressiyasında dəyişiklik yoxdur.) [(b) hissəsi Alfred Pasieka/Science Source.]

E. coli Ekspressiya Sistemi Klonlaşdırılmış Gendən Böyük Miqdarda Zülalları İstehsal Edə bilir

Çox zülal hormonları və digər siqnal və ya tənzimləyici zülallar normal halda çox aşağı qatılıqda ekspressiya olunurlar, ona görə də, standard biokimyəvi metodlarla onların böyük miqdarda ayrılması və təmizlənməsi çətinlik törədir. Belə zülalların müalicə məqsədi ilə geniş istifadəsi və eləcədə onların quruluşunun və funksiyalarının öyrənilməsi istiqamətində əsas tədqiqatlar bu zülalların səmərəli üsullarla və səmrəli qiymətə çoxlu miqdarda alınmasından asılıdır. *E. coli* hüceyrələrini aşağı-zənginliyə malik olan zülalları sintez edən fabrikə çevirən rekombinant DNT metodları indi, qranulosit koloniya-stimullaşdıran faktorun (granulocyte colony-stimulating factor – G-CSF), insulinin, boy hurmonlarının, və başqa insan zülallarının müalicə məqsədi ilə kommersiya baxımından istehsalı üçün istifadə olunur. Məsələn, G-CSF bakterial yoluxmaya qarşı kritik müdafiə rolunu oynayan faqositik ağ qan hüceyrələrinin - qranulositlərin istehsalını stimullaşdırır. Xərçəng xəstələrinə G-CSF-in yeridilməsi ilə idarə olunma kimyəvi müalicə agentlərinin səbəb olduğu qranulosit istehsalındakı azalmanı bərpa etməyə kömək edir, bununla da xəstələri kimyəvi müalicə dövründə təhlükəli yoluxmalara tutulmaqdan mudafiə edir.

Aşağı-zənginliyə malik olan zülalların byük miqdarda sintezi üçün ilkin pillə, əvəldə müzakirə etdiyimiz metodlarla tam uzunluqlu zülalı kodlaşdıran kDNT klonunu almaqdır.

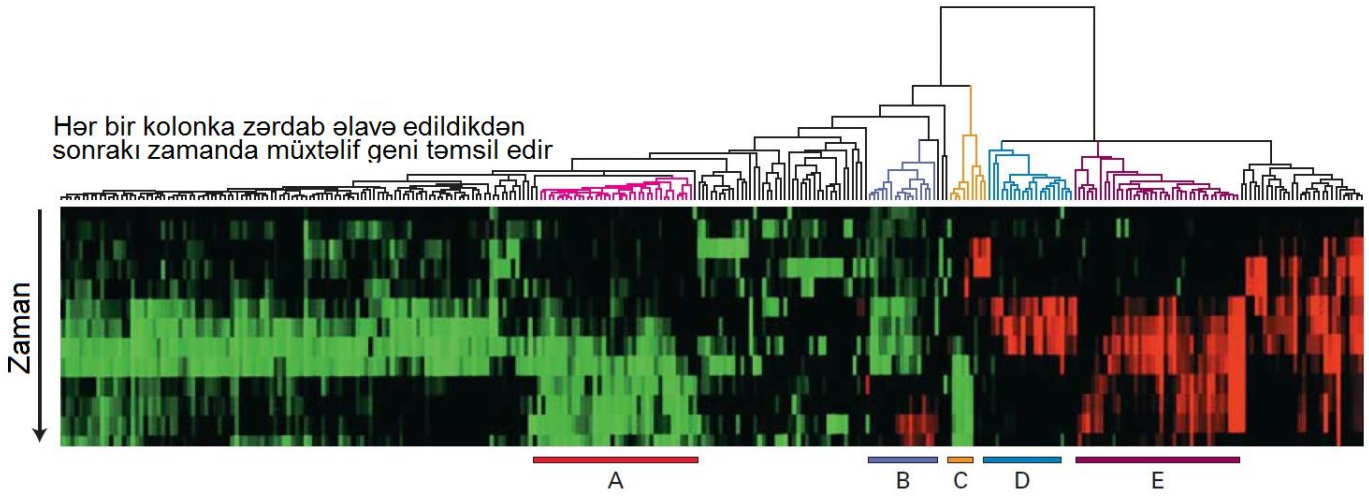
İkinci pillə, *E. coli* hüceyrələrinə keçirilərkən kodlaşdırılmış zülalları böyük miqdarda ekspressiya edən plazmid vektorların yaradılmasıdır. Bu cürə ekspressiya vektorunun yaradılmasında açar, kDNT-nin transkripsiyasının başlaya biləcəyi DNT ardıcıllığı promotorun daxil edilməsidir. Məsələn, hesab et ki, G-CSF-in ekspressiyasının kifayət qədər sadə sistemi Şəkil 6-28-də göstərilmişdir. Bu halda, G-CSF G-CSF-kodlaşdıran kDNT-yə yaxın ***lac*** promotorun yerlışdiyi plazmid vektorun transformasiya olunduğu *E.coli*-də ekspressiya olunur. Transkripsiya ***lac*** promotordan yüksək sürətlə baş verir, yalnız o zaman ki, laktoza və ya laktozanın analoqu, məsələn izopropiltioqalaktozid (IPTG) kultura mühütinə əlavə edilir. Arzu olunan zülalın daha da yüksək miqdarda sintezinə daha mürəkkəb olan *E. coli* ekspressiya sistemində nail olmaq olar.

E.coli ekspressiya sistemində istehsal olunan eukariot mənşəli zülalların təmizlənməsinə kömək üçün tədqiqatçılar çox vaxt kDNT-nin kodlaşdırdığı rekombinant zülalı modifikasiya edərək onların endogen *E. coli* zülalarından ayrılmasını asanlaşdırırlar. Çox istifadə olunan bu tipli modifikasiyaya kDNT-nin ucuna qısa nukleotid ardıcıllığının əlavə olunmasıdır ki, bu da zülalın translyasiyası zamnaı ekspressiya olunan zülalın C-sonluğunda 6 histidin qalığına malik olması ilə nəticələnir. Bu yolla modifikasiya olunmuş zülallar, nikel atomlarından ibarət qısqaca (xelat - chelate) malik olan affin matrisaya möhkəm birləşir, halbuki *E. coli* zülallarının əksəriyyəti belə matrisaya birləşməyəcək. Matrisaya birləşmiş zülallar, kolonkadakı mühitim pH-nı azaltmaqla nikel atomlarından ayrıla bilər. Çox hallarda, bu proses, təmizlənmiş, funksional rekombinant zülalların alınmasına imkan verir, əlavə olunmuş qısa aminturşu ardıcıllığı zülalın N- və ya C-sonluğunda olduğundan, o adətən zülalın biokimyəvi fəallığına təsir etmir.

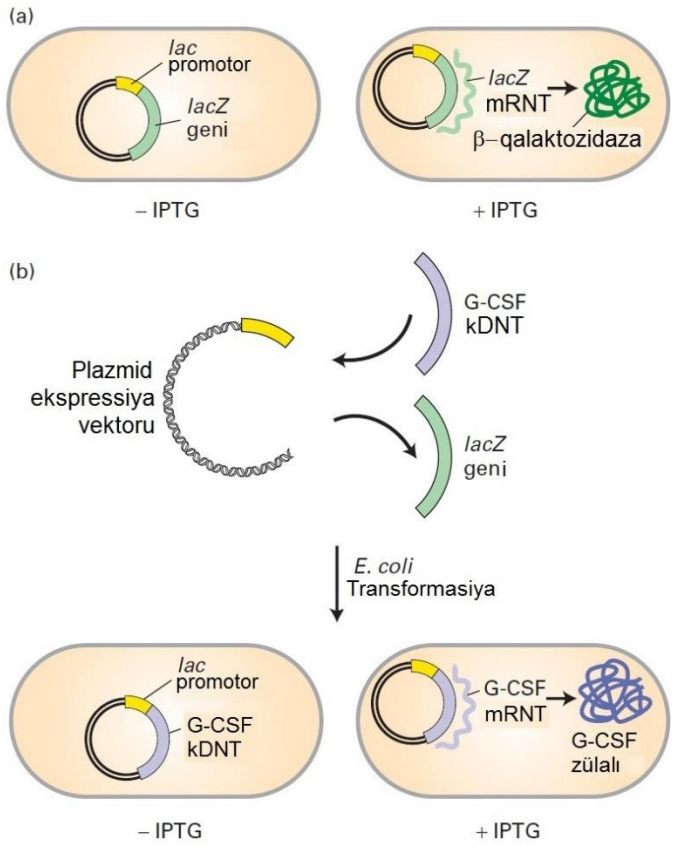
Plazmid Ekspressiya Vektoru Heyvan Hüceyrələrində Istifadə Üçün Dizayn Oluna Bilər

Baxmayaraq ki, bakterial ekspressiya sistemi bəzi zülalları böyük miqdarda yaratmaq üçün uğurla istifadə olunur, amma bakteriya bütün hallar üçün istifadə oluna bilmir. Zülalların funksiyasını öyrənmək üçün çox eksperimentlər müvafiq hüceyrə kontekstində genetik modifikasiya olunmuş zülalların ekspressiyasının kultura olunmuş heyvan hüceyrələrində aparılmasını tələb edir. Bunu həyata keçirmək üçün, genlər xüsusi eukariot ekspressiya vektoruna klonlaşdırılır və **transfeksiya** adlanan proseslə kulturada yetişdirilən heyvan hüceyrələrinə keçirilir. Heyvan hüceyrələrinə transfeksiyanın iki çox istifadə olunan metodu rekombinant vektor DNT-nin sahib hüceyrənin genom DNT-sinə inteqrasiya etməsi və ya etməməsi ilə fərqlənirlər.

Hər iki metodda kultura olunmuş heyvan hüceyrəsi onların ilkin rekombinant plazmid vektoru qəbul edə bilməsi üçün işlənilməlidir. Bu, hüceyrələrin plazma membranına nüfuz edən və onun DNT-ni keçiricilik qabliyyətini artıran lipid preparatlarına məruz qoyulması ilə yerinə yetirilə bilər. Alternativ olaraq, hüceyrələri, bir neçə min voltluq qısa elektrik şokuna məruz qoymaqdır, ***elektroporasiya*** kimi məlum olan bu metod hüceyrələrin DNT üçün keçiriciliyini müvəqqəti olaraq artırır. Adətən plazmid DNT kifayət qədər qatılıqda əlavə edilir ki, kultura olunan hüceyrələrin böyük əksəriyyətinin heç olmasa plazmid DNT-nin ən azı bir nüsxəsini ala bilməsi təmin olunsun. Tədqiqatçılar həmçinin, laboratoriyada transfeksiya eksperimentlərində viruslardan da istifadə edirlər, viruslar maraq DNT-sinə malik olmağa modifikasiya olunurlar və sonra, sahib orqanizmi rekombinant virusla yoluxduraraq transfeksiyanı həyata keçirirlər.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-27 Çoxsaylı mikroarrey ekspressiya eksperimentlərinin nəticələrinin klaster analizi birgə-tənzimlənən genləri təyin edir. Məməlilərin 8600 geninin, qan zərdabı-aclığı görən fibriblastların zərdabla təmin olunduqdan sonrakı 24 saatlıq zaman intervalında ekspressiyası mikroarrey analizləri ilə aşkar edilmişdir. Burada göstərilən klastr diaqramları, qan zərdabı-aclığı görmüş nümunələrlə müqayisə edərək genlərin ekspressiyasında oxşar dəyişiklikləri göstərməklə qruplaşdıran kompüter alqoritmlərinə əsaslanmışdır. Rənglənmiş bokslardakı hər bir sütun vahid bir geni göstərir, və hər bir sıra zaman anını göstərir: qırmızı boks ekspressiyanın nəzarətə nisbətən artmasını, yaşıl boks ekspressiyanın azalmasını, qara boks isə ekspressiyada kifayət qədər dəyişikliyin olmadığını göstərir. Yuxarıdakı ağac diaqramı göstərir ki, ekspressiya profili fərdi genlər üçün, genləri zamandan asılı olaraq onların ekspressiya profilindəki daha çox oxşarlığına görə bir yerdə qruplaşdırmaqla necə ierarxik qaydada təşkil oluna bilir. Aşağıdakı barlarda göstərildiyi kimi, bu eksperimentdə koordinasiya olunan tənzimlənən genlərin beş klasteri müəyyən olunmuşdur. Hər bir klaster, müxtəlif hüceyrə proseslərində fəaliyyət göstərən zülalları kodlaşdıran çoxsaylı genlərə malikdir: xolesterinin biosintezi (A), hüceyrə tsikli (B), dərhal-erkən-cavab (C), siqnal və angiogenez (D), və yara sağalması və toxuma remodelinqi (E). [Michael B.Eisen, Kalifornia Universiteti, Berkeley.]



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-28 Bəzi eukariot mənşəli zülallar *E. coli* hüceyrələrində *lac* promotorun olduğu plazmid vektordan istehsal oluna bilər. Plazmid ekspressiya vektoru *E. coli*-nin ***lac*** promotora və qonşuluğunda ***lacZ*** genə malik olan xromosom fraqmentinə malikdir. Laktozanın analoqu IPTG iştirakı ilə RNT polimeraza *lacZ* genini normal transkripsiya edərək *lacZ* mRNT-ni yaradır, o da kodlaşdırdığı zülal β-qalaktozidazaya translyasiya olunur. (b) *lacZ* geni ekspressiya vektorundan restriksiya fermenti vasitəsi ilə kəsilib atılaraq kolonlaşdırılan kDNT ilə, məsələn, indiki halda qranulosit-koloniya-stimullaşdıran faktoru (G-CSF) kodlaşdıran genlə əvəz oluna bilər. Nəticədə əmələ gəlmiş plazmid, *E. coli* hüceyrələrinə transformasiya olunduqdan sonra, hüceyrə kulturasına IPTG əlavə olunması və ardınca gələn *lac* promotordan başlanan transkripsiya G-CSF mRNT-ni yaradır və sonuncu da G-CSF zülala translyasiya olunur.

Keçici Transfeksiya İki ekspressiya metodundan ən sadəsi, ***keçici transfeksiya*** adlandırılan metod, əvvəldə təsvir olunan maya göbələyindəki şatl vektorlara bənzər vektorlardan istifadə edir. Məməlilərin hüceyrələrində istifadə etmək üçün plazmid vektorlar elə qurulurlar ki, məməlilərin hüceyrələrini yoluxdura bilən viruslardan alınmış replikasiya mənşəyinə, məməlilərin RNT polimerazası ilə tanınan güclü promotora və promotora bitişik olan elkspressiya olunmalı zülalı kodlaşdıran klonlaşdırılmış kDNT-yə malik olsunlar (Şəkil 6-29a). Bu cürə plazmid vektor məməlilərin hüceyrəsinə daxil olduqdan sonra virus replikasiya mənşəyi ona imkan verir ki səmərəli şəkildə replikasiya etsin və zülalları ekspressiya etmək üçün çoxsaylı plazmidləri yaratsın. Bununla belə, hüceyrə bölünməsi zamanı bu cürə plazmidlər düz qaydada seqreqasiya edərək bərabər şəkildə hər iki qız hüceyrəyə düşmürlər və müəyyən vaxatdan sonra, kulturada yeni nəsil hüceyrələrin əksər hissəsi bu plazmidə malik olmayacaq, ona görə də bu ***keçici transfeksiya*** adlandırılmışdır.

Stabil transfeksiya (transformasiya) Əgər keçirilən vektor sahib hüceyrənin genomuna inteqrasiya edirsə, genom həmişəlik dəyişilir və hüceyrəyə ***tramsformasiya olunmuş*** deyilir. İnteqrasiya, çox guman ki, məməlilərin normal halda DNT reparasiyasında və rekombinasiyasında fəaliyyət göstərən fermentlərlə həyata keçirilir. Çox istifadə olunan seçim markeri neomisin fosfotransferaza genidir (***neo^r*** kimi göstərilir), bu gen hüceyrəyə, G-418 kimi məlum olan neomisin tipli zəhərli kimyəvi birləşmələrə qarşı dözümlülük verir. ***Stabil transfeksiya*** ilə klonlaşdırılmış kDNT-nin ekspressiyasının əsas prosesləri Şəkil 6-29b-də təsvir edilmişdir. Yalnız o hüceyrələr yüksək qatılıqlı G-418 iştirak edən mühitdə yaşıyacaq və klon əmələ gətirəcəkdir ki, sahib hüceyrənin xromosomuna ekspressiya vektoru inteqrasiya etsin. Vektorun inteqrasiyası genomun təsadüfi hissələrində baş verdiyindən G-418-ə dözümlü fərdi transformasiya olunmuş klonlar daxil edilmiş kDNT-nin transkripsiya dərəcəsinə görə fərqlənəcəklər. Ona görə də, stabil transfeksiya adətən maraq zülalını yüksək səviyyədə istehsal edən klonları identifikasiya etmək üçün ekranlaşdırılır.

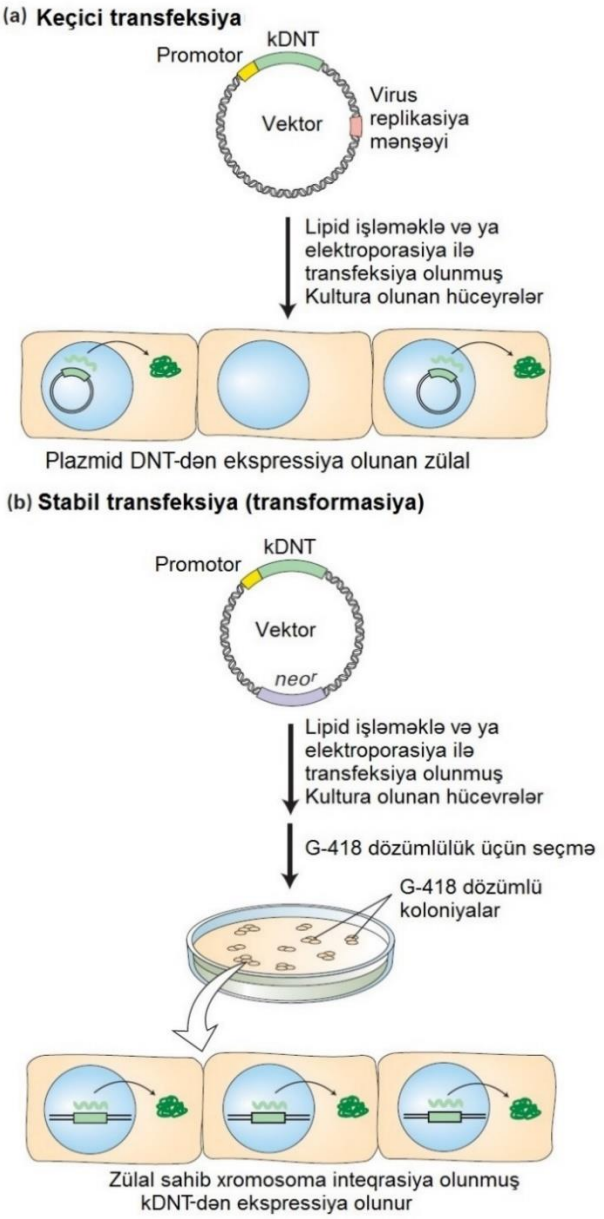
Retrovirus Ekspressiya Sistemi Tədqiqatçılar genetik materialı heyvan hüceyrələrinə daxil etmık üçün və sonra da xromosomal DNT-yə keçirmək və modifikasiya olunmuş genin heyvan hüceyrəsində stabil ekspressiyasının effektivliyini artırmaq üçün viruslar tərəfindən istifadə olunan əsas mexanizmləri tətbiq etdilər. Belə bir virus ekspressiya sistemi ***lentiviruslar*** kimi tanınmış retroviruslar sinifindən alınmışdır. Şəkil 6-30-də göstərildiyi kimi, hüceyrəyə keçici transfeksiya yolu ilə keçirilmiş üç müxtəlif plazmid, klonlaşdırılmış genin hədəf heyvan hüceyrələrinə səmərəli şəkildə keçirilməsi üçün yararlı olan rekombinant lentivirus zərrəciklərini almaq üçün istifadə olunmuşlar. ***Vektor plazmid*** kimi məlum olan birinci plazmid, lentivirus LTR ardıcıllığı ilə yanaşı yerləşən ***neo^r*** kimi seçilmə genindən sonra klonlaşdırılmış maraq geninə malikdir. Sol LTR ardıcıllıqlar lentivirus LTR ardıcıllıqlarını daşıyan RNT molekulunun sintezini hər iki tərəfə doğru yönəldir, beləliklə nativ retrovirus RNT-nin çox xassələrinə malik olur. Müvafiq sahib orqanizmdə bu LTR-daşıyan RNT virus zərrəciyinə bükülə bilir və sonra virus yoluxması ilə hədəf hüceyrəyə keçirilir. Hədəf hüceyrəyədə LTR ardıcıllıqlar geriyə transkripsiya yolu ilə RNT surətinin iki zəncirli DNT-yə köçürülməsini və Şəkil 8-14-də göstərilmiş hadisələrin ardıcıllığı ilə gedərək bu DNT-nin xromosomal DNT-yə inteqrasiyasını yönəldir. Bükülmə plazmidi kimi məlum olan ikinci plazmid, LTR-ə malik olan virus RNT-ni funksional lentivirus zərrəciklərinə bükməık üçün lazım olan əsas virus örtüyü zülalından başqa bütün virus genlərini daşıyır. Sonuncu plazmid, virus qabıq zülalının ekspressiyasına imkan verir və bu zülal, sonra rekombinant lentivirusla birləşdikdə imkan verir ki, əmələ gələn hibrid virus zərrəcikləri arzu olunan hədəf hüceyrə tiplərini yoluxdursun. Bu kontekstdə istifadə olunan ümumi qabıq zülalı vazikulyar stomatit virusunun qlikozülalıdır (VSV-G zülal) və bu zülal tam formalaşmış virus zərrəciklərinin səthində normal lentivirus qabıq zülalını asanlıqla əvəz edir və yaranmış virus zərrəciyinə imkan verir ki, məməlilərin geniş müxtəlifliyə malik olan hüceyrə tiplərini, o cümlədən hematopoetik sütun hüceyrələrini, neyronları, əzələ və qaraciyər

hüceyrələrini yoluxdursun. Hüceyrə yoluxduqdan sonra, virusun LTR ardıcıllığı ilə yanaşı yerləşən klonlaşdırılmış gen geriyə transkripsiya yolu ilə DNT-yə köçürülür və sonra nüvəyə daşınaraq orada sahib hüceyrənin genomuna inteqrasiya edir. Əgər lazım olarsa, stabil transfeksiyada olduğu kimi, stabil inteqrasiya olunan klonlaşdırılmış genə və *neo*^{r} marker geninə malik olan hüceyrə G-418-ə qarşı davamlılığına görə fərqləndirilərək seçiləcək. Xüsusi genlərin fəaliyyətinin fəalsızlaşması üçün istifadə olunan metodların çoxu (bax Bölmə 6.5) tələb edirki, kultura olunan hüceyrələrin tam populyasiyası eyni vaxtda genetik modifikasiya olunsunlar. Yaradılmış lentiviruslar belə eksperimentlər üçün xüsusən əhəmiyyətlidir, çünki onlar hüceyrəni çox yüksək effektivliklə yoluxdururlar, beləliklə populyasiyada olan hər bir hüceyrə ən azı bir lentivirusla yaradılmış plazmidə malik olur.

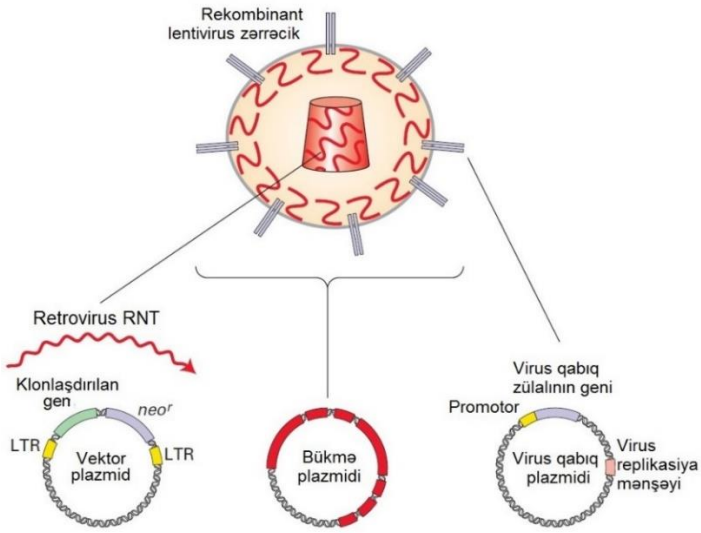
Gen və Zülal Yarlıklama Ekspressiya vektorları eukariotik zülalların ekspressiyasının və hüceyrədaxili lokalizasiyasının öyrənilməsi yollarını təmin edə bilir. Belə tədqiqatlar tez-tez hallarda, hüceyrə daxilində rahat təyin oluna bilən, ***yaşıl fluoressyent zülal*** (***GFP***) kimi reporter zülalların istifadəsinə əsaslanır (bax Şəkil 4-16). Burada biz, reporter zülalın ekspressiyasını maraq zülalı ilə birləşdirən hibrid geni yaratmağın iki yolunu təsvir edirik. Hibrid gen, ya modifikasiya olunmuş genə malik olan plazmid ekspressiya vektorunu transfeksiya etmək yolu ilə ya da Bölmə 6.5-də təsvir olunduğu kimi transgen heyvanları yaratmaqla yenidən hüceyrəyə keçiriləndə, reporter genin ekspressiyasından istifadə etməklə genin harada və nə zaman ekspressiya olunduğunu təyin etmək olar. Bu metod, əvvəldə təsvir olunmuş in situ eksperimentlərinə bənzər nəticələri təqdim edir, amma daha həssas və daha dəqiqliklə.

Şəkil 6-31, *C. elegans*-da qoxu (odorant) reseptor zülalının ekspressiyasını öyrənmək üçün iki müxtəlif tipli GFP-yarlıklama eksperimentlərinin istifadəsini təsvir edir. Odorant reseptorun promotoru, ***promotor qaynağı*** kimi məlum olan konfiqurasiyada birbaşa GFP-ni kodlaşdıran ardıcıllığa birləşdirildikdə GFP xüsusi neyronlarda ekspressiya olunur və bu neyronların sitoplazmasını doldurur. Əksinə, hibrid gen, GFP-ni qoxu reseptorunun kodlaşdırıcı ardıcıllığına birləşdirməklə konstruksiya olunanda, əmələ gələn ***qovşaq-zülal***ın lokalizasiyasını GFP fluoressyensiya yolu ilə sensor neyronların uzaq kipriciklərində tapmaq mümkün olur, normal halda reseptor zülalı bu saytda yerləşir.

Zülalların hüceyrədaxili lokalizasiyasını təyin etmək üçün GFP yarlıklamaya alternativ üsul, maraq genini məlum monoklonal anticism ilə tanınan aminturşu ardıcıllığından ibarət olan qısa uzantını kodlaşdıran qısa DNT ardıcıllığı ilə birləşdirməklə modifikasiya etməkdir. Anticismlə birləşə bilən belə qısa peptid **epitop** adlanır, ona görə də bu metod ***epitop yarlıklama*** kimi hüceyrələr, kulturanın saxlanıldığı müddətdə kDNT-nin-kodlaşdırdığı zülalı sintez etməyə davam edəcəklər. Geniş müzakirə üçün tekstə bax. məlumdur. Heceyrələr modifikasiya olunmuş genə malik olan plazmid ekspressiya vektoru ilə transfeksiya olunduqdan sonra, ekspressiya olunmuş zülalın epitop-yarlıklı forması hüveyrənin epitopa spesifik monoklonal anticismlə immunofluoressent nişanlnması yolu ilə aşkar oluna bilər. Verilmiş zülalın yarlıklanması üçün qısa epitopdan və ya GFP-dən istifadə etməyin seçimi, çox hallarda klonlaşdırlan genin hansı modifikasiyaya dözumlu olmasından və gen məhsulunun funksional qalmaslndan asılıdır.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-29 Xüsusi dizayn olunmuş plazmid vektorla keçici və stabil transfeksiya kultura olunan heyvan hüceyrələrində klonlaşdırılmış genin ekspressiyasına imkan verir. Hər iki metod, bir qayda olaraq, adi elementlərə - replikasiya mənşəyinə, seçmə markerinə (məsələn, *omp*^{r}) və *E. coli*-də artırmağa imkan verən və heyvan promotoru ilə bitişik olan klonlaşdırılan DNT-ni daxil etmək üçün polilinkerə malik olan plazmid vektoru istifadə edir. Sadəlik üçün, bu elementlər göstərilməmişdir. (a) Keçici transfeksiyada plazmid vektor rvirus üçün replikasiya mənşəyinə malikdir, ona görə də kultura olunan heyvan hüceyrəılərində replikasiya edə bilir. Vektor kultura olunan hüceyrənin genomuna daxil olmadığından kDNT ilə kodlaşdırılan zülalın istehsalı yalnız məhdud təkrarda olur (yalnız bir dəfə). (b) Stabil transfeksiya zamanı vektor, G-418-ə qarşı hüceyrədə dözümlülük yaradan *neo*^{r} kimi seçim markerinə malik olur. Eqzogen DNT-nin genomuna inteqrasiya olunan nisbətən az transfeksiya olunmuş heyvan hüceyrələri G-418 olan mühütdə seçilərək ayrılır. Vektor genoma inteqtrasiya etdiyindən, stabil transfeksiya edilmiş və ya transformasiya olunmuş bu bu hüceyrələr, kulturanın saxlanıldığı müddətdə kDNT-nin-kodlaşdırdığı zülalı sintez etməyə davam edəcəklər. Geniş müzakirə üçün tekstə bax.

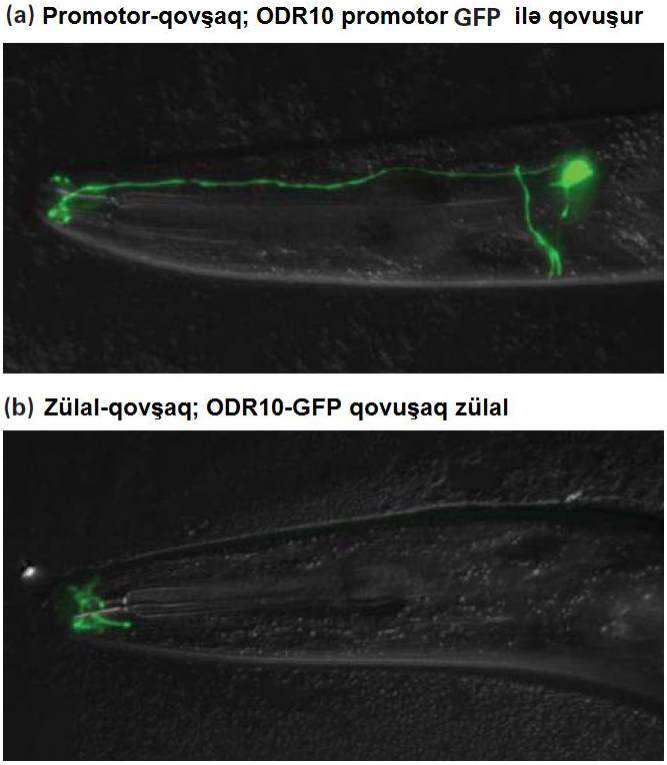


EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-30 Retrovirus vektoru klonlaşdırılmış genin məməlilərin genomuna səmərəli şəkildə inteqrasiyasında istifadə oluna bilər. Müzakirə üçün tekstə bax.

6.3 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSIYALARI

Genlərin Ekspressiyasını Öyrənmək üçün Klonlaşdırılmış DNT Fraqmentlərinin İstifadə Olunması

- Kompleks qatışıqda tək bir DNT fraqmentini aşkar edə bilən Sauzerin blottinq gel elektroforezin, ayrılmış bəndlərinin filtirə köçürülməsini (blottinq) və radionişanlanmış komplementar DNT prob ilə hibridləşdirməsini özündə birləşdirir (bax Şəkil 6-24). Oxşar metod olan Norzerin blottinq hibridləşmə də, qatışıqda spesifik RNT-ni aşkar edir.
- Spsifik mRNT-nin canlı hüceyrədə mövcudluğunu və paylanmasını in situ hibridləşmə ilə aşkar etmək olar.
- DNT mikroarrey analizləri eyni zamnada, müxtəlif tipli hüceyrələrdə və ya eyni hüceyrədə müxtəlif şəraitlər altında minlərlə genin ekspressiyasının nisbi səviyyəsini aşkar edir (bax Şəkil 6-26).
- Çoxsaylı mikroarrey ekspressiya eksperimentlərinin klaster analizləri müxtəlif şraitlərdə oxşar tənzimlənn genləri əşkar edə bilir. Bu cürə birgə-tənzimlənən genlər, adətən, bioloji oxşar funksiyaya malik olan zülalları kodlaşdırırlar.
- Eukariotik ekspressiya vektorları klonlaşdırılmış geninlərin maya göbələyində və məməlilərin hüceyrələrində
- Plazmidlərdən yaradılmış ekspressiya vektorları, klonlaşdırılmış genlərdən zülalların çoxlu miqdarda istehsalına imkan verir.
- ekspressiyasında istifadə oluna bilər. Bu metodların əhəmiyyətli tətbiqi, zülların GFP ilə və ya anticismi təyin etmək üçün istifadə olunan epitop ilə yarlıklanmasıdır.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-31 Gen və zülal yarlıklama klonlaşdırılmış gendən ekspressiya olunan zülalların hüceyrədəki yerini təyin etməyə imkan verir. Bu eksperimentdə, *C. elegans*-ın kimyəvi odorant reseptorunu kodlaşdıran geni Odr10 yaşıl fluoressyent zülalın (GFP) gen ardıcıllığına qovşaq edilmişdir. (a) Promotor-qovşaq GFP-in promotora və Odr10-un birinci dörd aminturşu kodonuna qoşulması ilə yaradılmışdır. Bu zülal, *C. elegans*-ın başında xüsusi sensor neyronların sitoplazmasında ekspressiya olunur. Qeyd etmək lazımdır ki, hüceyrə cismi (qırıq-qırıq oxlar) və sensor dendritlər (qalın oxlar) fluoressent nişanlanmışlar. (b) Zülal-qovşağı GFP-ni Odr10-un tam uzunluqlu kodlaşdırıcı ardıcıllığının sonuna birləşdirməklə yaradılmışdır. Bu halda, Odr10-GFP qovşaq zülal, sensor neyronların ucunda membrana hədəf olmuşdur və yəqin ki, sensor kipriciklərin yalnız distal ucunda əmələ gəlir. Müşahidə olunan paylanmadan belə nəticəyə gəlmək olar ki, o Odr10 zülalın spesifik neyronlarda normal lokalizasiyasını əks etdirir. (a)-da göstərilən promotor-qovşaqda Odr10 lokalizasiya ardıcıllığı olmadığından ekspressiya olunan GFP, sensor kipriciklərin yalnız distal ucunda toplanmaqdansa bütün hüceyrə sitoplazmasını doldurur. [Nəzakətlə Ashish Maurya.]

6.4 Insanda Xəstəlik Genlərinin Müəyyənləşdirilməsi və Yerinin Təyini

İnsanın irsən keçmiş xəstəlikləri insanın qüsurlu genlərinin fenotipik nəticəsidir. Cədvəl 6-2-də çox rast gəlinən irsən keçən xəstəliklərin siyahısı verilir. Baxmayaraq ki, "xəstəlik" genləri yeni yaranan nəsildə yeni mitasiyaların nəticəsində əmələ gələ bilir, amma irsən ötürülmüş xəstəliklərin əksəriyyəti artıq mövcud olan və artıq dəfələrlə bir nəsildən digər nəsilə ötürülmüş mutant allellərdən törəyir.

Nəsillə ötürülən istənilən insan xəstəliklərinin əsas səbəblərinin açılmasında tipik ilkin mərhələ təsir olunan genləri və onların kodlaşdırdığı zülalları təyin etməkdir. Xəstəlik genlərinin anrdıcıllıqlarının və onların məhsullarının, ardıcıllığı və funksiyası məlum olan genlər və zülallarla müqayisəsi xəstəliklərin əmələ gəlməsinin molekulyar və hüceyrə səviyyəsində izahını tapmağa imkan verəcək. Tarixən, tədqiqatçılar irsən keçmiş xəstəliklərin molekulyar əsaslarının təxmin edilməsində fenotipik əlamətləri istifadə etmişdilər. Belə uğurlu gumanetmələrin ilkin nümunələrindən biri, qan hüceyrələrinin xəstəliyi kimi məlum olan orarqvari-hüceyrələrin anemiyası fərziyyəsinin yaranması olmuşdur və guman olunurdu ki, hemoqlobinin qüsurlu olması nəticəsində meydana gəlmişdir. Bu ideya oraqvari-hüceyrə hemoqlobinini formalaşdıran irsən keçmiş iki Hb^s allelə malik olan fərdlərdə, qırmızı qan hüceyrələrində oraqvari-şəkildə deformasiyanı əmələ gətirən, qüsurlu hemoqlobin molekulunun polimerləşməsinə səbəb olan, hemoqlobindəki spesifik amin turşusunun əvəz olunmasının təyin edilməsinə səbəb olmuşdur

Amma, irsi xəstəliklər üçün cavabdeh olan genlər əksər hallarda, təsir olunan genlərin təbiəti və ya onların kodlaşdırdığı zülallar barədə heç bir əvvəlki biliklər və ya ağlabatan fərziyyələr olmadan tapılmalıdır. Bu bölmədə biz, insan genetiklərinin irsi xəstəlikərə cavabdeh olan genləri, ailələr üzrə xəstəliklərin seqreqasiyasını izləyərək necə tapdıqlarını görəcəyik. Xəstəliklərin seqreqasiyası çoxsaylı başqa genetik markerlərin seqreqasiyası ilə korelyasiya edir və tədricən sonda təsir olunmuş genlərin xromosomlarda yerinin təyin olunmasına aparıb çıxarır. Bu məlumat, insan genomunun ardıcıllığı üzrə biliklərlə birlikdə, nəticə etibarı ilə təsir olunmuş genlərin və xəstəliklərə səbəb olan mutasiyaların dəqiq təyin olunmasına imkan verir .

CƏDVƏL 6-2 İnsanın Çox Rastgəlinən İrsi Xəstəlikləri

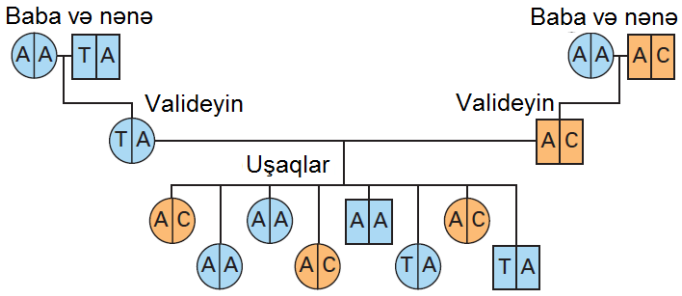
Xəstəliklər	Molekulyar və hüceyrə qüsurları	Təsir dairəsi
Autosomal Resessiv		
Oraqvari-hüceyrə xəstəliyi	Aormal hemoqlobin qırmızı qan hüceyrələrinin deformasiyasına səbə olur, kapillyarlarda ilişib qala bilir, amma malariyaya dözümlülük verir.	Afrika mənşəli sub-Sahara 1/625
Mukovisidoz fibrozu	Epiteli hüceyrələrinin qüsurlu xlorid kanalı (CFTR) olan zamanı ağ ciyərdə həddindən artıq selik yaranır.	Avropa mənşəli 1/2500
Fenilketonuria (FKU)	Fenilalanin metabolizminin qüsurlu fermenti (tirozin hidroksiliaza) fenilalaninin artıqlığını yaradır, bu isə, dieta ilə məhdudlaşmayan halda mental gecikməyə səbəb olur.	Avropa mənşəli 1/10000
Tay-Saks xəstəliyi	Qüsurlu heksozaminidaza fermenti, neyronların lizosomlarında sfinqolipidlərin artıqlığının yaranmasına səbəb olur, neyronal inkişafı çətinləşdirir	Şəriqi Avropa cuhudlarında 1/1000
Avtosomal Dominant		
Hantinqton xəstəliyi	Qüsurlu sinir zülalı (hantinqton) aqreqatlar şəkilində yığıla bilir və sinir toxumalarında zədələnməy səbəb olur.	Avropa mənşəli 1/10000
Hiperxolesterolemiya	Qüsurlu LDL reseptoru qanda xolesterinin artıqlığına, və erkən infarkta səbəb olur	Fransız mənşəli kanadalılarda 1/122
X-əlaqəli Resessiv		
Duşenna əzələ distrofiyası (DMD)	Qüsurlu sitoskelet zülalı (distrofin) zəifləmiş əzələ funksiyasına səbəb olur	Kişilərdə 1/3500
Hemofiliya A	Qüsurlu qan laxtası faktoru VIII, nəzarət oluna bilməyən qanaxmalara səbəb olur	Kişilərdə 1-2/10000

Monogen Xəstəliklər İrsiyyətin Üç Profilindən Birini Göstərir

İnsanın, bir spesifik genində baş verən mutasiya nəticəsində əmələ gələn genetik xəstəliklər ***monogen xəstəliklər*** kimi adlandırılır və onları əmələ gətirən allellərin təbiətindən və xromosomda yerləşməsindən asılı olaraq müxtəlif irsiyyət profilini əks etdirilər. Xarakterik bir profil, autosomlarda dominant allellə nümayiş etdirilən profildir (bu, cinsiyyət xromosomu olmayan 22 insan xromosomlarından biridir). ***Autosomal dominant*** allel hetereziqotda ekspressiya olunduğundan, adətən xəstə fərdin valideynlərindən ən azı biri xəstəliyə malik olmalıdır. Çox hallarda, xəstəliyin dominant allellə əməl gəldiyi halda, xəstəlik həyatda gec, reproduktiv yaşda biruza verir. Əgər belə deyilsə (yəni, dominant deyilsə) təbii seçmə insanın təkamülü dövründə bu allelləri kənarlaşdırmalıdı. Autosomal dominant xəstəliklərə nümunə Hantinqton xəstəliyini göstərmək olar, bu həyatın orta və ya son dövrlərində baş qaldıran neyronal degeneratv xəstəlikdir. Əgər, iki valideyindən istənilən biri mutant *HD* allelini daşıyırsa, onun övladlarının hər birinin (cinsiyyətindən asılı olmayaraq) mutant alleli irsən almağa və xəstəliyi daşımağa 50% ehtimalı var (Şəkil 6-32a).

Autosomda resessiv allel kifayət qədər fərqli seqreqasiya profili nümayiş etdirir. Autosomal resessiv allel üçün hər iki valideyin, uşaqlarının xəstəlik riski altında olması üçün

autosomal resesiv allelin heteroziqot *daşıyıcı* olmalıdır. Heteroziqot valideynlərin hər bir uşağının hər iki resessiv alleli almaq və xəstə olmaq üçün 25 faiz ehtimalı var, 50 faizinin isə bir normal və bir mutant alleli almaq, beləliklə daşıyıcı olmaq ehtimalı var, 25 faizin isə iki normal alleli almaq ehtimalı (şansı) var. Autosomal resessiv xəstəliklərin bariz nümunəsi kistoz (mukovisidoz) fibrozisdur, bu *CFTR* kimi məlum olan xlorid-kanal geninin qüsurlu olması nəticəsində baş verir (Şəkil 6-32b). Qohum şəxslərin (məsələn, birinci və ikinci nəsil kuzenlərin) eyni resessiv allellərin daşıyıcısı olmaq üçün nisbətən yüksək ehtimalı var. Beləliklə, qohum olmayan valideynlərdən doğulmuş uşaqlara nisbətən qohum valideynlərdən doğulmuş uşaqların autosomal resessiv pozuntulara görə homoziqot olma və ona görədə təsirə məruz qalama (xəstəliyə tutlma) ehtimalı daha böyükdür.

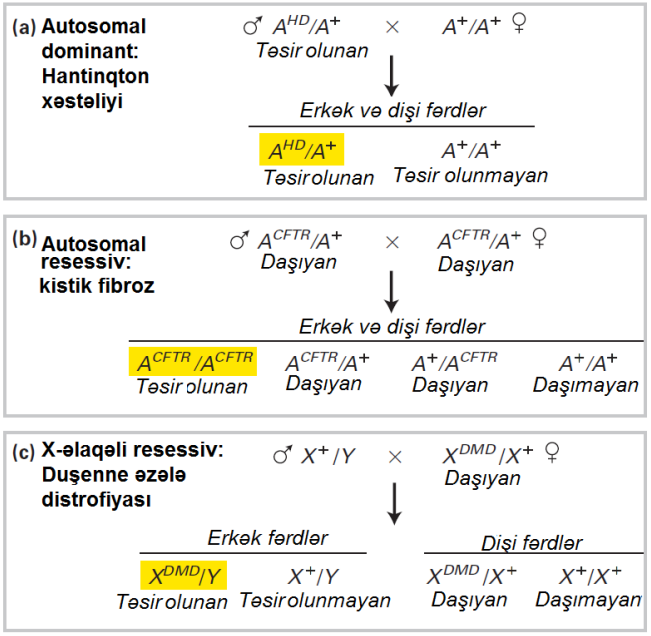


EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-33 Tək-Nukleotid Polimirfizmləri (SNP-lər) genetik markerlər kimi istifadə oluna bilər. Xromosom rayonlarında DNT-nin SNP analizlərinə əsaslanan hipotetik şəcərə. Bu ailədə, SNP A, T və ya C nukleotidlər kimi mövcud olur. Hər bir fərd iki allelə malikdir: bəzilərində hər iki xromosomda A olur, başqaları isə bu saytda heteroziqot olurlar. Dairələr dişi cinsi göstərir, kvadratlar isə erkək cinsi göstərir. Mavi rəng təsir olunmayan fərdləri göstərir, narıncı rənglər isə əlamətin olduğu fərdləri göstərir. Analizlər göstərir ki, əlamət SNP-də C ilə seqreqasiya edir.

İrsiyyətin üçüncü ümumi modeli**, *X-əlaqəli resessiv*** alleldir. X-xromosomdakı resessiv allel ən çox, ana tərəfdən alınmış yalnız bir X-xromosoma malik olan kişilərdə (erkək fərdlərdə) ortaya çıxacaq (ekspressiya olunacaq), amma qadınlarda olmayacaq, çünki həm anadan həm də atadan alınmış iki X-xromosoma malikdirlər. Bu, qadınlara nisbətən kişilərdə xəstəliyin daha tez-tez üzə çıxdığı cinsiyyətlə-bağlı fərqli seqreqasiya profilinin yaranmasına aparır. Məsələn, Duşenne əzələ distrofiyası (**Duchenne muscular dystrophy DMD**) adlanan və xüsusən də kişilərə təsir edən əzələ degenerativ xəstəliyin yaranmasına X xromosomda olan resessiv allel səbəb olur. DMD cinsiyyətlə-bağlı olan tipik seqreqasiya modelini nümayiş etdirir, bu zaman heteroziqot olduğuna tgörə fenotipik cəhətdən normal olan analar daşıyıcı olurlar və onlar DMD alleli ötürməklə xəstəliyi də 50 faiz öz yeni oğlan nəslinə ötürürlər (Şəkil 6-32c).

DNT Polimorfizmləri İnsan Mutasiyalarında Əlaqələrin-Xəritələşdirməsində Markerlər Kimi İstifadə Olunur

İrsiliyin tipi təyin olunduqdan sonra, xəstəlik allelinin yerini təyin etmək üçün növbəti pillə onun mövqeyini, Bölmə 6-1-də təsvir olunduğu kimi, genetik-əlaqələrin əsas prinsiplərindən istifadə etməklə məlum olan genetik markerlərə görə genetik xəritələşdirməkdir. Xromosom boyunca paylanmış artıq xəritələşdirilmiş çoxsaylı müxtəlif genetik əlamətlərin və ya markerlərin mövcud olması yeni mutasiyanın xəritələşdirilməsinə şərait yaradır. Daha çox markerlər əldə olunarsa mutasiya daha da dəqiqliklə xəritələşdirilə bilər. İnsanın yüksək-rezolyusiyalı genetik xəritəsinin alınması üçün lazım olan genetik markerlərin sıxlığı hər 5 centimorqan (cM) üçün bir markerdir (əvvəllər qeyd olunduğu kimi, bir genetik xəritə vahidi və ya sentimorqan, 100 nəsildə bir rekombinant fərdi əməl gətirən, xromosom boyu iki mövqe arasındakı məsafə hesab olunur). Beləliklə yüksək-imkanlı (rezolyusiyalı) genetik xəritələşdirmə, insanın hər bir xromosomunun uzunluğu boyunca yerləşmiş məlum olan mövqedə 25 və ya daha artıq genetik markerin olmasını tələb edir.



ŞƏKİL 6-32 İnsanın monogen xəstəliklərinin üç ümumi irsilik modeli. Təbii-forma autosom (A) və cinsiyyət xromosomları (X və Y) üstündə yazılmış müsbət işarəsi ilə verilmişdir. (a) Hantinqton xəstəliyi kimi autosomal dominant pozuntuda yalnız bir mutant allel olması xəstəliyin üzə çıxması üçün kifayət edir. Əgər valideynlərdən hər hansı biri mutant ***HD*** allel üçün heteroziqotdursa onun övladı mutant allelə malik olmağa və uyğun olaraq xəstəliyi almağa 50 faiz ehtimalı var. (b) Kistik fibroz kimi autosomal resessiv pozuntuda xəstəliyin yaranması üçün iki mutant allelin olması lazımdır. Hər iki valideyin, övladlarının xəstəliyə məruz qalması və ya daşıyıcı olması riski üçün mutant *CFTR* genin heteroziqot daşıyıcı olmalıdırlar. (c) Duşenna əzələ distrofiyası kimi X-əlaqli resessiv xəstəlik X xromosomda baş verən resessiv mutasiya ilə əmələ gəlir və cinsiyyətlə-bağlı seqreqasiya profili nümayiş etdirir. Mutant *DMD* allelə görə heteroziqot anaların doğduğu oğlan ovladları mutant alleli irsən almağa və xəstələnməyə 50 faiz ehtimalı var. Heteroziqot anaların doğduğu qız ovladları daşıyıcı olamğa 50 faiz ehtimalı var.

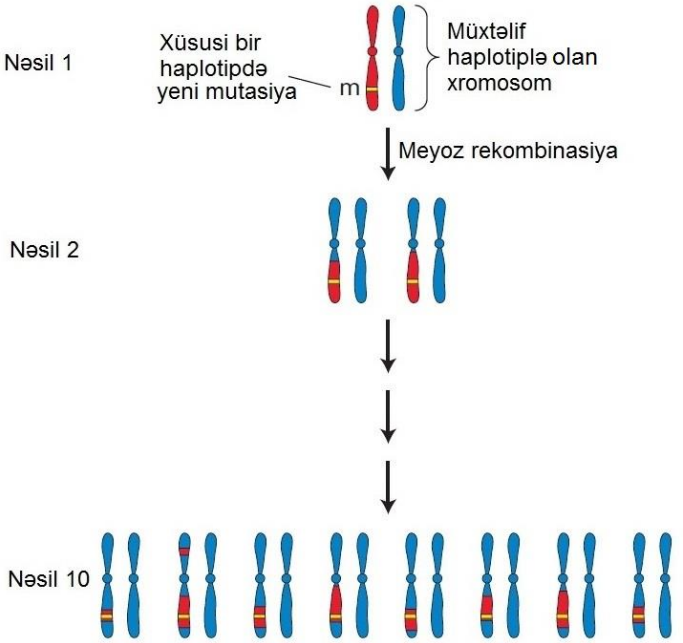
Genetik tədqiqatlarda çox istifadə olunan eksperimental orqanizmlərdə mutasiyanın genetik xəritələşdirilməsi üçün asanlıqla təyin oluna bilən fenotipə malik çoxsaylı markerlər mövcuddur. İnsanda genetik xəritələşdirmə tədqiqatlarını aparmaq üçün kifayət qədər fenotipik markerlər yoxdur. Amma, əvəzində rekombinant DNT texnologiyası istifadə olunan zəngin DNT-əsaslı molekulyar markerləri mümkün etmişdir. İnsan genomunun çox hissəsi zülal kodlaşdırmadığından fərdlər arasında böyük miqdarda ardıcıllıq variasiyası mövcuddur. Həqiqətən də, hesablanmışdır ki, qohum olmayan fərdlər arasında nukleotid fərqləri orta hesabla hər 10^3 nukleotiddən bir təyin oluna bilər. Əgər DNT ardıcıllığındakı, ***DNT polimorfizmi*** adlandırılan bu variasiyalar bir nəsildən növbəti nəslə izlənilə bilərsə onlar əlaqələndirici (linkage) tədqiqatlar üçün genetik markerlər ola bilər. Hal-hazırda insan genomunda lokalizasiyası xəritələşdirilmiş 10^4 məlum olan fərqli polimorfizmdən ibarət olan bir panel insanlarda genetik əlaqə tədqiqatları üçün istifadə olunur.

Tək-nukleotid-polimorfizmlər (SNP-lər) daha zəngin tipi təşkil edir, ona görə də, maksimum imkanlı (rezolyusiyalı) genetik xəritənin qurulması üçün əhəmiyyəylidir (Şəkil 6-33). DNT polimorfizminin başqa bir əhəmiyyətli tipi, bir-, iki- və ya üç-əsaslı ardıcıllıqların təkrarlarının dəyişkən sayından ibarətdir. Sadə ardıcıllıqların təkrarı (SSR) və ya *mikrosatellitlər* kimi məlum olan bu cürə polimorfizm, çox ehtimal ki, DNT replikasiyası zamanı templeytin və ya yeni sintez olunmuş zəncirlərin rekombinasiyası və ya sürüşməsi mexanizmi yolu ilə formalarşmışdır. SSR-lərin əhəmiyyətli xüsusiyyəti odur ki, çox hallarda müxtəlif fərdlər müxtəlif sayda təkrarlara malik olurlar. SSR-in çoxsaylı versiyalarının mövcud olması, onu verilmiş genalogiyada daha informativ seqreqasiya modeli yaratmaqda inandırıcı edir, ona görə də xəsətlik genlərinin xəritələşdirilməsində daha çox istifadə olunan edir. Bu polimorfizimlər PZR amplifikasiya və DNT ardıcıllığının oxunması yolu ilə aşkar oluna bilər.

Bağlantı Tədqiqatları Xəstəlik Genlərinin 1 Sentimorqan Rezolyusiyalı Xəritəsini Yarada Bilir

Tam detallarına keçməzdən öncə, allellərin yaratdığı ayrıca dominant əlamətlərin (məsələn, ailə hiperxolesterolemiya) xəritələşdirməsinin necə mümkün olmasına baxaq. Birinci pillə, xəstəliyə malik olan fərdlərin olduğu bütün ailə üzvlərindən DNT nümunələrinin əldə olunmasıdır. Sonra, hər bir xəstə və qeyri xəstə fərdlərdən alınmış DNT nümunəsi, böyük miqdarda DNT polimorfizminin (SSR və ya SNP markerlər istifadə oluna bilər) oxşarlığını təyin etmək üçün analiz olunur. Xəstəliklə birlikdə seqreqasiya etməyə meyilli olan polimorfizmləri tapmaq üçün ailə daxilində hər bir DNT polimofizminin seqreqasiya modeli tədqiq olunan xəstəliyin seqreqasiyası ilə müqayisə olunur. Xəstəlik alleli ilə əlaqəli olmayan polimorfizm xəstəliklə birlikdə heç bir əhəmiyyətli ko-seqreqasiya etmək meyilliliyini nümayiş etdirməyəcək, halbuki xəstəliklə əlaqəli olan polimorfizm həmişə xəstəliklə ko-seqreqasiya edəcək, çünki xəstəlik allelərini və polimorfizmi ayıran rekombinasiya hadisələri çox seyrək olacaq. Seqreqasiya verilənlərinin kompüter analizləri hər bir DNT polimorfizmi və xəstəlik-törədən allel arasındakı mümkün ola bilən əlaqəni hesablamaq üçün istifadə olunur. İdeal şərait daxilində, əlaqənin statistik sübut olunması üçün ailədə ən azı 10 fərdin seqreqasiya profili tələb olunur.

Praktikada segregasiya məlumatları adətən eyni xəstəliyi olan müxtəlif ailələrdən toplanıb birləşdirilir. Müayinə edilə bilən ailənin sayı çox olduqca, əldə edilə bilən əlaqələrin sübutunun statistik əhəmiyyəti daha böyük olur və xəstəliklə bağlı olan DNT polimorfizmi ilə xəstəlik alleli arasında ölçülə bilən məsafədə daha böyük dəqiqlik əldə oluna bilər. Xəstəlik genləri ilə DNT polimorfizmlər paneli arasındakı əlaqələrin yoxlanıla biləcəyi əksər ailə tədqiqatları maksimum 100-ə qədər fərddə sınaqdan keçirilir. Fərdlərin bu sayı, 1 sentimorqan məsafəyə kimi imkan verən belə xəritələşdirmə tədqiqatlarının həllində praktiki olaraq yuxarı limiti və ya 7.5×10^5 əsas cütü (əc) ölçüdə fiziki məsafəni təşkil edir.



ŞƏKIL 6-34 İnsan populyasiyasının əlaqə-müvazinatsızlıyı tədqiqatları genlərin yüksək rezolyusiyalı xəritələşdirilməsində istifadə oluna bulər. Yeni xəstəlik mutasiyası, əcdad xromosom kontekstində ***haplotip*** kimi məlum olan polimorfizmlər dəsti arasında meydana gəlir (qırmızı kölgə ilə göstərilir; xromosomun mavi seqmentləri orjinal mutasiyanın baş verdiyi əcdad haplotipləri deyil, ümumi populyasiyadan ayrılmış ümumi haplotipləri təmsil edir). Bir çox nəsildən sonra, xəstəlik mutasiyasını daşıyan xromosomlar xəstəlik mutasiyasından rekombinasiya yolu ilə ayrılmamış əcdad haplotipin seqmentlərini də daşıyacaqlar. Xəstəlik mutasiyasına yaxın olan rayonlar çox guman ki, əcdad haploytiplərdir. Bu hadisə ***əlaqə-müvazinətsizliyi*** kimi məlumdir. Xəstəlik mutasiyasının yerləşmə vəziyyəti, xəstəlik mutasiyasına malik olan xromosomları əcdad haplotipə uyğun olan yüksək konservativliyə malik olan polimorfizmə görə skan etməklə təyin oluna bilər

Əlaqə müvazinətsiszliyi adlandırılan fenomen alternativ strategiyanın əsasını təşkil edir və çox hallarda xəritələşdirmə tədqiqatlarının həllində daha yüksək dərəcədə imkanları yaradır. Bu yanaşma, keçmişdə bir çox nəsildə meydana gələn tək bir mutasiyanın nəticəsi kimi xüsusi populyasiyada tapılmış genetik xəstəliklərə tətbiq oluna bilər. Mutasiyanın baş verdiyi əcdad

xromosom tərəfindən daşınan belə DNT polimorfizmləri ümumilikdə bu xromosomun ***haplotipi*** kimi adlandırılır. Xəstəlik allelinin bir nəsildən növbəti nəsilə keçdiyi zaman yalnız xəstəlik genlərinə çox yaxın olan polimorfizmlər rekombinasiya nəticəzində ondan ayrılmayacaqlar. Bir çox nəsildən sonra, xəstəlik geninə malik olan rayon aşkar olunacaq, çünki bu rayon, çoxsaylı nəsillərdə qorunub saxlanmış konservativ əcdad xromosomun haplotipini daşıyan yeganə xromosom rayonu olacaq (Şəkil 6-34). Genetiklər, populyasiyada bütün təsir olunmuş fərdlərdə spesifik markerlərin paylanmasını qiymətləndirməklə, xəstəliklə sıx bağlı olan DNT markerlərini təyin edə bilər və beləliklə, müqayisəli dərəcədə kiçik rayonda xəstəliklə-bağlı olan genin lokalizasiyasını tapa bilər. İdeal şəraitdə, əlaqə-müvazinətsizliyi tədqiqatları xəritələşdirmə tədqiqatlarının rezolyusiyasını (imkanlarını) 0.1 sentimorqana qədər artıra bilər. Bu metodun həlledici gücü, polimorfizm və xəstəlik allelinin ata-babanın xromosomunda ilk dəfə göründüyü vaxtdan bəri, hər hansı bir zamanda mayoz rekombinasiya hadisəsi ilə ayrılıb-ayrılmadığını təyin etmək qabiliyyətindən irəli gəlir - bəzi hallarda bu, xəstəlik geni ilə sıx əlaqəli olan markerdirvə yüzlərlə mayozdan sonra da rekombinasiya yolu ilə onlardan heç vaxt ayrılmamışdır.

Klonlaşdırılmış DNT-də Xəstəlik Geninin Yerini Tapmaq Üçün Əlavə Analizlər Lazımdır

Baxmayaraq ki, əlaqə xəritələşdirmələri, insan xəstəlikləri geninin yerini adətən 10^5 əsas cütünə malik olan rayonda təyin edir, amma bu ölçüdə olan rayonda 10-a qədər çoxsaylı, müxtəlif genlər yerləşə bilər. Xəritələşdirmə tədqiqatlarının son məqsədi, klonlaşdırılmış DNT seqmentində maraq geninin yerini müəyyən etmək və sonra bu fraqmentin nukleotid ardıcıllığını təyin etməkdir. Xromosomun genetik xəritəsinin və fiziki xəritəsinin nisbi miqyası plazmid klonlarının və nukleotid ardıcıllıqlarının düzülmüş dəstinə uyğun olaraq Şəkil 6-35-də göstərilmişdir.

Genom daxilində xəstəlik geninin daha sonrakı lokalizasiyasının bir strategiyası, tədqiq olunan rayondakı DNT tərəfindən kodlaşdırılan mRNT-nin təyinindən ibarətdir. Normal və xəstə fərdlərdən alınmış toxumalarda gen ekspressiyasının müqayisəsi, müəyyən bir xəstəlik geninin normal ekspressiya olunduğu toxumaları göstərə bilər. Məsələn, başqa toxumalar deyil yalnız əzələyə fenotipik təsir göstərən mutasiya, yalnız əzələ toxumasında ekspressiya olunan gendə ola bilər. Normal və xəstə fərdlərdə mRNT-nin ekspressiyası əsasən Norzerin blottinq, mikroarrey analizləri yolu ilə və ya toxuma kəsiyində nişanlanmış DNT və ya RNT-nin in situ hibridləşməsi yolu ilə təyin edilir. Norzerin blottinq, in situ hibridləşmə və ya mikroarrey eksperimentləri, mutant və normal toxumalarda həm ekspressiya dərəcəsini həm də ekspressiya olunmuş mRNT-nin ölçüsünü müqayisə etməyə imkan verir. Baxmayaraq ki, in situ hibridləşmənin həssaslığı Norzern blottinqin həssalığından azdır, amma o, yenə də verilmiş toxumada aşağı səviyyədə ekspressiya olunan, amma bu toxumanın bəzi hüceyrlər yarımsinifində yüksək səviyyədə ekspressiya olunan mRNT-nin identifikasiyasında çox faydalı ola bilir. Xəstəliyə məruz qalmış müxtəlif fərdlərdə, normal fərdlərlə müqayisədə dəyişilmiş və ya itmiş mRNT, xəstəliyin törəməsinə səbəb olan, funksiyası pozulmuş zülalı kodlaşdıran gözəl namizəd ola bilər.

Çox hallarda, xəstlik-törədən allellərin yaranmasına səbəb olan nöqtəvi mutasiyalar, mRNT-lərin ekspressiyasında və ya elektroforetik mobilliyində aşkar oluna bilməyən dəyişikliyə səbəb ola bilir. Belə ki, əgər xəstə və normal fərdlərdə ekspressiya olunan mRNT-lərin müqayisəsi namizəd mRNT-lərdə aşkar oluna bilən fərqi tapmırsa, o zaman mRNT-ləri kodlaşdıran DNT rayonlarında nöqtəvi mutasiyaların axtarışı həyata keçirilir. İndi DNT ardıcıllığının oxunmasının yüksək effektivliyə malik olan metodları mümkün olduğundan, tədqiqatçılar nöqtəvi mutasiyanı təyin etmək üçün çox hallarda xəstə fərdlərdən ayrılmış DNT-nin namizəd rayonunun ardıcıllığın təyin edirlər. Ümumi strategiya, xəstəliyin ardıcıl şəkildə üzə çıxdığı fərdlərin DNT-sində zərərli dəyişikliyə səbəb olan kodlaşdırıcı ardıcıllığın axtarışıdır. Bu yanaşmanın çatışmazlığı odur ki, təsir olunan genə yaxın olan rayon maraq geninə aid olmayan təbii yaranmış polimorfizmlərə malik ola bilər. Funksiyasına görə xəstəliyə aidiyyəti olmayan belə polimorfizmlər, maraq genini daşıyan DNT fraqmentinin səhv identifikasiyasına səbəb ola bilər. Bu məqsədlə, daha çox mutant allellərin analizinin mümkün olması genin daha dəqiq identifikasiya olunması ehtimalını artırır.

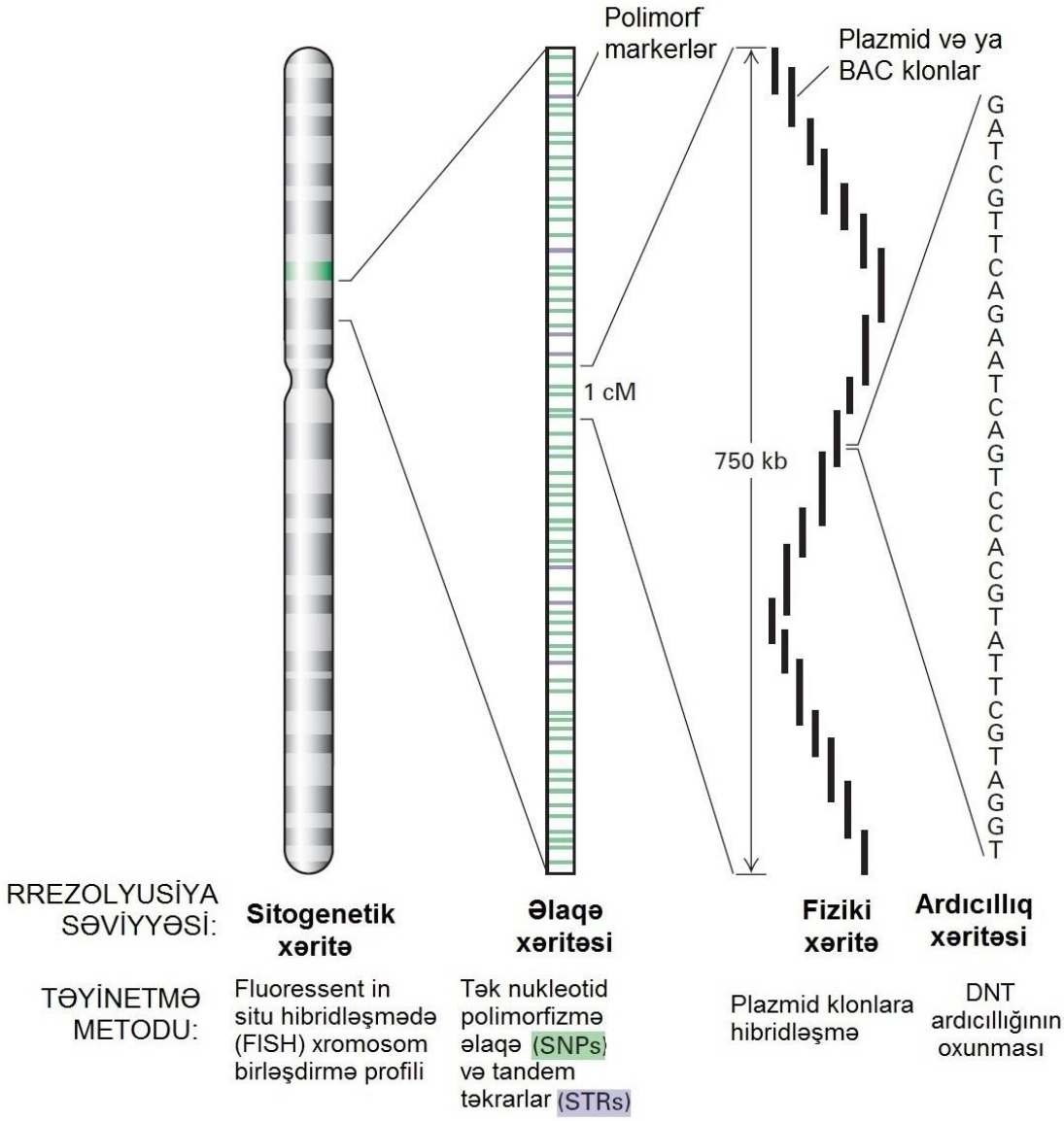
Çox İrsi Xəstəliklər Bir Çox Genetik Qüsurun Nəticəsidir

İndiki dövürdə insanın molekulyar səviyyədə öyrənilmiş irsi xəstəliklərinin çoxu monogenetik xəstəliklərdir, bunlar bir gen tərəfindən törədilən və aydın şəkildə görünə bilən xəstəliklərdir. Xüsusi bir gendə mutasya nəticəsində baş vermiş monogen xəstəlik, Şəkil 6-32-də göstərilən, xarakterik irsiyyət modelindən birini nümayiş etdirir. Ümumi monogen xəstəliklərlə assosasiyada olan genlər, artıq əvvəldə təsvir olunmuş DNT-əsaslı markerlərdən istifadə etməklə xəritələşdirilmişdir.

Amma, birçox başqa irsi xəstəliklər daha mürəkkəb irsiyyət modeli nümayiş etdirir və xəstəliyin əsasında duran genetik səbəbi təyin etməyi daha da çətinləşdirir. Belə əlavə mürəkkəbliklərdən bir tipi və daha çox rast gəlinəni ***genetik heterogenlikdir***. Belə hallarda, çoxsaylı müxtəlif genlərdən istənilən birində olan mutasiya(lar) eyni xəstəliyin yaranmasına səbəb ola bilir. Məsələn, retinanın degenerasiyası ilə xarakterizə olunan və adətən kor olmağa (görmə qabliyyətinin itirilməsinə) səbəb olan **retiniti piqmentoza**, 60-dan çox müxtəluf genin istənilən birində baş verən mutasiya nəticəsidə də yarana bilir. İnsanda əlaqələndirmə (linkage) tədqiqatlarında, çoxsaylı müxtəlif ailələrdən alınmış verilənlər, bir qayda olaraq xəstəlik geni ilə məlum olan molekulyar markerlər arasında statistik əhəmiyyətli əlaqələrin mövcud olub olmadığını təyin etmək üçün birləşdirilməlidir. Retiniti piqmentoza kimi nümayiş etdirilən genetik heterogenlik belə yanaşmanı qarışdıra (səhv sala) bilir, çünki bir ailədən alınmış xəritələşdirilmə verilənlərində istənilən statistik meyl başqa bir ailədə səbəb olan fərqli genlə alınmış verilənlər tərəfindən ləğv edilməyə meyilli olur.

İnsan genetikləri, retiniti piqmentoza ilə əlaqəli olan çoxsaylı genləri təyin etmək üçün iki müxtəlif yanaşmadan istifadə etdilər. Birinci yanaşma, məlum olan DNT polimorfizmləri ilə xəstəliyə səbəb olan tək bir gen arasındakı əlaqənin təyin edilməsində, statistik cəhətdən əhəmiyyətli dəlilləri təmin etmək üçün xəstəliyun təsirinə məruz qalmış

kifayət qədər çox sayda nümayəndəyə malik olan, həddən artıq böyük ailələr daxilində xəritələşdirmə tədqiqatlarına əsaslanır. Belə tədqiqatlarda təyin olunan genlər göstərdilər ki, retiniti piqmentozanın yaranmasına səbəb olan bir sıra mutasiyalar retinada zəngin zülalları kodlaşdıran genlərdə baş verir. Bu sübutların ardınca, genetiklər öz diqqətlərini, başqa fərdləri retina piqmentozaya görə ekranlaşdıranda retinada yüksək dərəcədə ekspressiya olunan genlər üzərində cəmlədilər. Namizəd genlərin bir hissəsi üzərində ekranlaşdırma (seçim) cəhdlərini etmək üçün əlavə məlumatlardan istifadə edən bu yanaşma, gözün torlu qişasında zülalları kodlaşdıran çoxsaylı müxtəlif genlərdə xəstəliyə səbəb olan əlavə nadir mutasiyaların müəyyənləşdirilməsinə səbəb oldu.



ŞƏKİL 6-35 İnsan xromosomunun genetik və fiziki xəritələri arasında qarşılıqlı əlaqə. Diaqram, müxtəlif səviyyədə analiz olunmuş insan xromosomunu təsvir edir. İşıq mikroskopu altında metafaza mərhələsindəki xromosoma kondensasiya olunmuş vəziyyətində bütöv halda baxıla bilir, və xüsusi nukleotid ardıcıllıqlarının yerləşməsi fluoressyent in situ hibridləşmə (FISH) metodu ilə təyin edilə bilir. Növbəti səvviyyədə, genetik əlamətlər DNT-əsaslı genetik markerlərə görə xəritələşdirilə bilər. Xromosomun lokal seqmqntləri, Sauzern blotting hibridləşməsi və ya PZR ilə təyin olunmuş DNT ardıcıllıqları səviyyəsində analiz olunur. Nəhayət, sonda əhəmiyyətli genetik fərqlər xromosom DNT-sinin nukleotid ardıcıllığındakı fərqlərlə daha dəqiqliklə təyin edilə bilər.

Insan xəstəliklərinin genetik analizində daha da ağırlaşmanı, ən azı müəyyən qədər irsiliyə malik olan diabet, ürək xəstəlikləri, piylənmə, xərçəngə meyillilik və müxtəlif əqli (mental) pozğunluqlar əmələ gətirirlər. Bunlar və bir-çox başqa xəstəliklər ***poligen xəstəliklər*** hesab oluna bilərlər, o mənada ki, müxtəlif genlərin allelləri fərd daxilində birgə təsir göstərərək xəstəliyin əmələ gəlməsinə və ağırlaşmasına səbəb olurlar. İnsanda kompleks poligen əlamətlərin sistematik olaraq necə xəritələşdirilməsi, bu gün insan genetikasında çox əhəmiyyətli və çətin problemlərdən biridir.

Genetik heterogenliyi nümayiş etdirən və ya poligen olan xəstəlikləri öyrənmək üçün bu günün ən ümüdverici metodlarından biri, xromosomun xüsusi bir rayonunun irsiliyi ilə xəstəliyə malik olmaq meyilliliyi arasında statistik korelyasiyanın, **genom-geniş-assosiasiya tədqiqatları (genome-wide association study –GWAS)** kimi tanınan prosedurudan istifadə edərək axtarılmasıdır. GWAS-dan istifadə edərək xəstəlik-əmələ gətirən genlərin təyin edilməsi, əvvəldə təsvir olunmuş əlaqə müvazinətsizliyi fenomeninə əsaslanır. Əgər allel fərddə insanın təkamülü gedişində son zamanlarda meydana gəlmiş xəstəliyin yaranmasına səbəb olursa və ya hətta onu öz təsiri altına salırsa, xəstəliyi-əmlə gətirən allel, xromosomda onunla qonşuluqda yerləşən xüsusi DNT-əsaslı markerlərlə assosasiyada olmağa meyilli olacaq. Xüsusi bir xəstəliyə malik olan fərdlərin populyasiyasında və eləcə də, xəstəliyə malik olmayan fərdlərin nəzarət (kontrol) populyasiyasında böyük miqdarda DNT-markerlərini yoxlamaqla, xəstəliyin baş verməsi ilə korelyasiya etməyə meyilli olan xromosom rayonları təyin edilə bilər. Bu yanaşmanın gücü genomun xüsusi bir rayonunda irsiyyətlə xəstəlik arasında kiçik, amma əhəmiyyətli korellyasiyanı identifikasiya etmək üçün çox sayda fərdlərdən alınan verilənləri skan edən kompüter alqoritmlərinə əsaslanır. Sonra, genom ardıcıllığının oxunması və başqa metodlar, bu rayonda xəstəliyi əmələ gətirən mümkün olan mutasiyanın təyin edilməsində istifadə oluna bilər. Bu yolla, bəzi fərdlərdə, amma hamısında məcburi deyil, xəstəliyə meyillilik yaradan allellər təyin edilə bilər. Baxmayaraq ki, namizəd xəstəlik genlərinin təyinində GWAS çox güclü vasitə ola bilər, amma xüsusi mutasiyanı daşıyan fərdin xəstəliyin təsiri altına düşə bilməsini təyin etmək üçün daha çox işlər tələb olunur.

Eksperimental orqanizmlərdə insan xəstəliyi modelləri həmçinin piylənmə və diabet kimi murəkkəb (kompleks) əlamətlərin genetikasının açılmasına da kömək edə bilər. Məsələn, siçanda geniş-miqyaslı nəzarət olunan seleksiya eksperimentləri, insan xəstəliklərinin analoqları olan xəstəliklərlə bağlı olan siçan genlərini təyin etməyə imkan verir. Belə tədqiqatlarla müəyyən olunmuş siçan genlərinin insan ortoloqları, çox guman ki, müvafiq insan xəstəliklərinin yaranmasında iştirak edən namizəd genlər olacaq. Sonra insan populyasiyasından alınan DNT xəstəliklərdən əziyyət çəkən fərddə meydana çıxmağa meyilli olan, amma xəstəliyə tutulmamış fərddə olmayan namizəd genlərin xüsusi allellərini təyinin etmək üçün yoxlanıla bilər. Belə "namizəd gen" yanaşması indiki zamanda, insanın əsas poligen xəstəliklərinin yaranmasında iştirak edən genlərin axtarılmasında intensiv şəkildə istifadə olunur.

6.4 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSIYALARI

Insanda Xəstəlik Genlərinin Müəyyənləşdirilməsi və Yerinin Təyini

- İnsanda irsi xəstəliklər və başqa əlamətlər irsiyyətin üç əsas tipini göstərir: autosomal dominant, autosomal resessiv və X-əlaqəli resessiv (bax Şəkil 6-32).
- İnsan xəstəliklərinin və başqa əlamətlərin genləri, meyoz gedişində onların genomda yerləri məlum olan markerlərlə ko-seqreqasiyasını təyin etməklə xəritələşdirilə bilər. Gen xüsusi markerə nə qədər yaxın olarsa, onlar bir o qədər də birgə-seqreqasiya edərlər.
- İnsan geninin böyük dəqiqliklə xəritələşdirilməsi, xromosomlar boyu yayılmış minlərlə molekulyar markerləri tələb edir. Ən faydalı markerlər, genomda kodlaşdırmayan rayonlarda, fərdlər arasında DNT ardıcıllığındakı fərqlərdir (polimorfizm).
- İnsan genlərinin xəritələşdirilməsində istifadə olunan DNT polimorfizmlərinə tək-nukleotid polimorfizmləri (SNP-lər) və qısa tandem təkrarlar (STR-lar) daxildirlər.
- Əlaqə xəritələşdirmələri çox hallarda, insanın xəstəlik geninin yerini, 10-a qədər çoxsayl genlərin yerləşdiyi xromosom rayonunda tapa bilir. Namizəd rayonunda maraq genini təyin etmək üçün, adətən, ekspressiya analizlərinin aparılması və normal tipli və xəstəlikdən əziyyət çəkən fərdlərdə DNT ardıcıllıqlarının müqayisəsi və analizi tələb olunur.
- Bəzi irsi xəstəliklər, müxtəlif fərdlərdə müxtəlif genlərdə baş verən mutasiyalar nəticəsində yarana bilər (genetik heterogenlik). Başqa xəstəliklərin meydana çıxması və sərtliyi, eyni fərddə çoxsaylı genlərin mutant allellərinin təzahürindən asılıdır (poligen əlamətlər). Belə xəstəliklərlə bağlı olan genlərin xəritələşdirilməsi, geniş-genom-assosiasiya tədqiqatlarında xəstəlik və xüsusi xromosom yerləri arasında statistik korelyasiyanın tapılması ilə nail oluna bilər

6.5 Eukariotlarda Xüsusi Genlərin Funksiyasının Dayandırılması

Son zamanlar DNT və zülal ardıcıllıqlarının izahı, genom DNT-nin ardıcıllıq profilindən və kodlaşdırılmış zülalların ardıcıllığının funksiyası məlum olan zülallarla oxşarlığından istifadə edərək çoxsaylı yeni genlərin tapılmasına gətirib çıxardı. Fəsil 8-də müzakirə olunduğu kimi, ardıcıllıq axtarışı ilə zülalların müəyyən olunmuş ümumi funksiyaları, məlum olan anoloji zülallara əsaslanaraq əvvəldən təxmin oluna bilər. Amma, belə "yeni" zülalların dəqiq in vivo rolu ola bilsin ki, müvafiq genlərin mutant formalarının mövcud olmadığı halda aydın olmasın. Bu bölmədə, biz orqanizmin genomunda spesifik genlərin normal funksiyasını qırmağın bir neçə yolunu təsvir edirik. Nəticədə əmələ gəlmiş mutant fenotipin analizi çox hallarda normal genin və onun kodlaşdırdığı zülalın in vivo funksiyasını aşkar etməyə kömək edir.

Belə gen-fəalsızlaşma metodunun əsasında üç əsas yanaşma durur: (1) normal genin başqa nukleotid ardıcıllığı ilə əvəz olunması; (2) ekspressiya olunan normal zülalın funksiyasını pozan zülalı kodlaşdıran allelin daxil edilməsi (intraduksiyası); (3) genin ekspressiya etdiyi mRNT-nin

dağıdılmasını təşviq etmək. Normal endogen gen, birinci yanaşmaya əsaslanan metodla modifikasiya olunur, amma o başqa yanaşmalarda modifikasiya olunmur.

Çox hallarda tədqiqatçılar genin xüsusi bir allelinin təsirini öyrənməyi bütövlükdə genin inaktivasiyasının təsirini müşahidə etməkdən üstün tuturlar. Məsələn, hüceyrə bölünməsində onkogenin dominant allelinin təsirinin yoxlanılması genin normal nüsxəsinin birinin belə bir dominant allell ilə əvəz olunması tələb olunur. Son zamanlara qədər, demək olar ki, bu tipli dəqiq genom redaktəsinə nail olmaq mümkün deyildi, amma indi faq DNT-sində ardıcıllıq-spesifik kəsilmələrin edilməsi üçün bakterial sistemdəki variasiya, bu bölmənin sonunda müzakirə edəcəyimiz kimi, məməlilər də daxil olmaqla geniş müxtəliflikdə orqanizmlərdən alınan hüceyrələrdə kiçik silinmələrin (delesiyaların) edilməsinə, hətta xüsusi ardıcıllıqların dəyişilməsinə imkan vermək üçün uyğunlaşdırılmışdır.

Normal Maya Geni Homoloji Rekombinasiya Yolu ilə Mutant Allellə Əvəz Oluna Bilir

S. cerevisiae maya genomunu modifikasiya etmək xüsusən iki səbəbə görə asandır: müəyyən şərait altında maya hüceyrələri eqzogen DNT-ni qəbul edirlər və daxil olmuş DNT qəbul edən hecyrənin homoloji xromosom saytlarında asanlıqla mübadiləyə girir (dəyişdirilir). İdentik DNT sahələrinin belə spesifik, hədəflənmiş rekombinasiyası maya xromosomunda istənilən genin mutant allellə əvəz olunmasına imkan verir. (Bizim Bölmə 6.1-də gördüyümüz kimi homoloji xromosomlar arasında rekombinasiya meyoz zamanı təbii şəkildə baş verir.)

Maya genlərini bu formada pozmağın bir populyar metodunda, seçim markerinə malik olan və sonra maya hüceyrələrinə keçirilən (transfeksiya olunan) *qırılma konstruksiyanı* yaratmaq üçün PZR istifadə olunur. Şəkil 6-36a-da göstərildiy kimi, seçim markerlərin PZR amplifikasiyası üçün, maya geninin əvəz olunma üçün nəzərdə tutulmuş cinah hissəsi ilə eyni olan, hər biri 20 nukleotid ardıcıllığında olan iki praymer tərtib olunmuşdur. Nəticədə əmələ gələn amplifikasiya olunmuş konstruksiya, mayanın hədəf geninin sonluğuna uyğun olan, 20 nukleotid cütü uzunluqda yandan birləşmiş seçilən markeri təşkil edir (məsələn, *kanMX* gen *neo*^{r} kimi G-418-ə dözümlülüyü verir). Hədəf olunan endogen geninin iki nüsxəsindən biri pozulma konstruksiuası ilə əvəz olunmuş transformasiya olunan diploid maya hüceyrələri onların G-418-ə olan dözümlülüyünə görə və ya başqa seçim fenotipinə görə təyin oluna bilər. Bu heteroziqot maya göbələyi hüceyrələri hədəf genin funksiyasından asılı olmayaraq normal biturlər, amma bu hüceyrələrdən əmələ gəlmiş haploid sporların yarısı yalnız pozulmuş alleli daşıyacaq (Şəkil 6-36b). Əgər gen həyati əhəmiyyətə malikdirsə, onda pozulmuş alleli daşıyan sporlar yaşamayacaq.

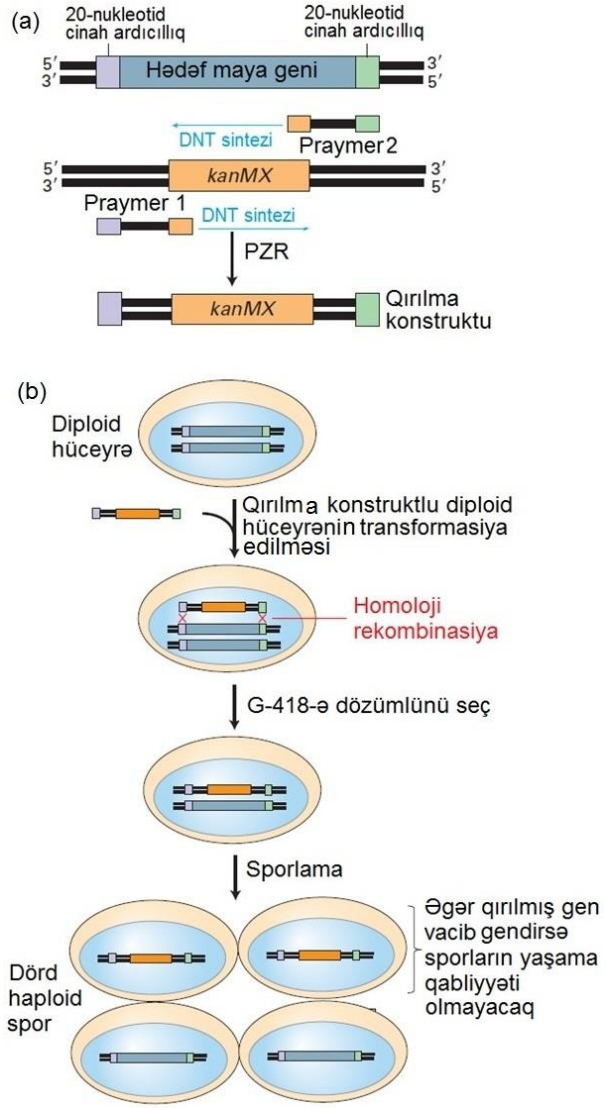
Bu metodla maya göbələyi genlərinin pozulması, *S. cerevisiae* tam genom ardıcıllığının analizi tərəfindən müəyyən olunmuş zülalların rolunun qiymətləndirilməsi üçün xüsusən faydalıdır (bax Fəsil 8). Təxminən 6000 genin hər biri diploidlərdə *kanMX* pozulma konstruktu ilə pozulur, haploid sporlarda da gen dağıdılması baş vermişditr. Bu analizlər göstərdi ki, 6000 maya genindən təxminən 4500 qədəri həyat qabiliyyətli haploid sporlarda məskunlaşa bilir, gözlənilmədən böyük sayda genlərin qeyri-zəruru genlər olması aşkar edilir. Bəzi hallarda xüsusi bir genin pozulması incə bir qüsurun yaranmasına səbəb olur, bu da laboratoriya şəraitində bitən maya hüceyrələrinin həyat qabliyyətinə güzəştə getmir. Alternativ olaraq, pozulmuş geni daşıyan hüceyrələr ehtiyt nüsxə hesabına və ya kompensasiya yolları əməliyyatına görə həyat qabliyyətinə malik olurlar. Bunun mümkünlüyünü öyrənmək üçün, hal-hazırda maya genetikləri sintetik letal effekti axtarırlar, bu da lazımsız funksiyalara malik olan əhəmiyyətsiz genləri aşkar edə bilir (bax Şəkil 6-9c).

Genlər Eksperimental Tənzimlənən Promotorun Nəzarəti Altında Yrləşdirilə Bilir

Hərçənd ki, hüceyrənin bitməsi üçün tələb olunan lazımlı genin pozulması həyat qabliyyəti olmayan sporları yaradacaq, bu metod kodlaşdırılmış zülalların hüceyrədə həqiqətdə nə etmələri barədə az məlumat verir. Spesifik genin hüceyrənin böyüməsi və həyat qabliyyətini necə təmin etməsini öyrənmək üçün tədqiqatçılar, bitmiş hüceyrələrin populyasiyasında geni seçimli şəkildə fəalsızlaşdırmağı bacarmalıdırlar. Bunu həyata keçirmək üçün bir metodda, zəruri genin transkripsiyasını seçimli şəkildə dayandırmaq məqsədi ilə tənzimlənən promotordan istifadə edilir.

Bu məqsəd üçün faydalı olan promotor maya göbələyinin *GAL1* promotorudur, bu promotor qalaktoza mühitində bitən hüceyrələrdə fəal olur, amma qlükoza mühitində bitən hüceyrələrdə tamamilə qeyri fəal olur. Bu yanaşmada, kodlaşdırıcı ardıcıllıqğı *GAL1* promotora liqasiya olunmuş zəruri gen (X) mayanın şatl vektoruna keçirilir (bax Şəkil 6-15a). Sonra, rekombinant vektor haploid maya hüceyrəsinə keçirildikdə X gen qırılır. Transformasiya olunmuş haploid hüceyrələr qalaktoza mühitində bitəcək, çünnki X genin vektordakı normal nüsxəsi qalaktozanın iştirakı ilə ekspressiya olunacaq. Hüceyrələr tərkibində qlükoza olan mühitə keçirildikdə X geni daha transkripsiya olunmur, hüceyrələr böləndüyündən kodlaşdırılmış X zülalının miqdarı azalacaq və tədricən tükənmə vəziyyətinə çatacaq, bu da funksiyanın-itirilməsi mutasiyasına bənzəyəcək. Qlükoza muhitinə keçdikdən sonra bu hüceyrələrin fenotipində müşahidə olunan dəyişiklik hansı hüceyrə prosesinin zəruri X geni ilə kodlaşdırılan zülaldan asılı olduğunu göstərə bilər.

Bu metodun ilkin tətbiqi zamanı, tədqiqatçılar mayada sitozol *Hsp70* genlərin funksiyasını tədqiq etdilər. Bütün dörd lazımsız *Hsp70* genin pozulmuş olduğu haploid hüceyrələrin hamısı qeyri həyat qabliyyətinə malik oldular, yalnız tərkibində *Hsp70* genlərin nüsxəsi olan vektoru daşıyan hüceyrələr istisna oldu, çünki, tərkibində qalaktoza olan mühitdə *Hsp70* genlər *GAL1* promotordan ekspressiya oluna bildilər. Qlükoza mühitinə keçirildikdən sonra vektoru daşıyan hüceyrələr, kifayət qədər Hsp70 fəallığı olmadığından tədricən bitməni dayandırdılar. Ölməkdə olan bu hüceyrələrin dəqiq analizi aşkar etdi ki, onların ifraz etdiyi zülallar artıq endoplazmatik şəbəkəyə (ER) daxil ola bilmir. Bu tədqiqatlar ifrazat zülallarının ER-ə keçirilməsində Hsp70 zülalların gözlənilməyən rolu barədə ilk sübutu verdi, bu prosesin ətraflı izahı Fəsil 13-də verilmişdir.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-36 Pozulma konstruksiyaları keçirilmiş homoloji rekombinasiya mayada hədəf genləri fəalsızlaşdıra bilir. (a) Hədəf geni pozmaq üçün yararlı olan konstrukt PZR yolu ilə hazırlana bilər. Bu məqsədlə yaradılmış iki praymerin hər biri, maya göbələyinin hədəf geninin bir ucuna, eləcə də G-418-ə davamlılıq verən *kanMX* kimi seçim marker genini daşıyan DNT seqmentinin amplifikasiyası üçün lazım olan ardıcıllıqlara homoloji olan 20 nukleotiddən ibarət ardıcıllığa malikdir. (b) Qəbul edən *Saccharomyces* hüceyrələri gen-pozan-konstruktla transformasiya olunanda, konstruktun ucları və müvafiq xromosom ardıcıllıqları arasındakı homoloji rekombinasiya *kanMX* genini xromosoma inteqrasiya edərək oradakı hədəf genin ardıcıllığını əvəz edəcək. Rekombinant diploid hüceyrələr, tərkibində G-418 olan mühitdə bitəcək, amma, transformasiya olunmayan hüceyrələr bitməycək. Əgər hədəf gen həyatı əhəmiyyətə malikdirsə, rekombinant diploid hüceyrələrin spor əmələgəlməsindən sonra yaranan haploid sporların yarısı qeyri-həyat qabliyyətinə malik olacaqlar.

Xüsusi Genlər Siçanın Rüşeyim Xəttində Həmişəlik Fəalsızlaşdırıla Bilər

Maya genlərinn pozulması üçün istifadə olunan metodların çoxu ali eukariotların genləri üçün də tətbiq oluna bilər. Nokaut genli və ya sadəcə olaraq "nokaut" heyvanları almaq üçün bu dəyişilmiş genlər, homoloji rekombinasiya yolu ilə rüşeyim xəttinə keçirilə bilir. Spesifik genləri dağıdılmış nokaut siçanlar, məməlilərin inkişafını, davranışını və fiziologiyasını öyrənmək üçün çox güclü eksperimental sistemlərdir. Onlar həmçinin, insanın bəzi genetik xəstəliklərinin mkolekulyar əsaslarının öyrənilməsi üçün də əhəmiyyətlidir.

Nokaut siçan iki-mərhələli prosedura ilə yaradılır. Birinci mərhələdə, xüsusi hədəf genin pozulmuş allelinə malik olan DNT konstrukt rüşeyim sütun (ES) hüceyrəsinə daxl edilir. Blastosistlərdən alınmış bu hüceyrələr bir çox nəsillər boyu kulturada bitə bilir (bax Şəkil 21-7). Transfeksiya olunmuş hüceyrələrin kiçik bir fraksiyasında, daxil edilmiş DNT hədəf gen ilə homoloji rekombinasiyaya uğrayır, hərçənd ki, qeyri homoloji xromosom saytlarında rekombinasiya daha tez-tez baş verir. Homoloji rekombinasiyanın və genlə-istiqamətlənən insersiyanın baş verdiyi hüceyrıənin seçilməsi üçün, ES hüceyrələrə daxil edilmiş rekombinant DNT konstruktuna seçilə bilən iki marker gen qoşulmalıdır (Şəkil 6-37). Bu genlərdən, G-418-ə dözümlülük yaradan biri (***neo***$^{\mathbf{r}}$) hədəf gen (X) daxilinə keçirilmiş və beləliklə onu qırmışdır. Başqa seçim geni, herpes simpleks virusun timidin kinaza geni (***tk***$^{\boldsymbol{HSV}}$) isə hədəf-geninin ardıcıllığından kənar konstrukta keçirildi. Rekombinant DNT konstruktu ilə xromosom üzərindəki homoloji sayt arasında rekombinasiyaya uğrayan ES hüceyrələr ***neo***$^{\mathbf{r}}$ geninə malik olacaq, amma ***tk***$^{\boldsymbol{HSV}}$ inkorporasiya etməyəcək. Çünki, ***tk***$^{\boldsymbol{HSV}}$ sitotoksik nukleotid analoq qansiklovirə qarşı *həssaslıq* verir, arzu olunan rekombinant ES hüceyrələr həm G-418 həm də qansiklovirə qarşı sağ qalma qabliyyətlərinə görə seçilə bilərlər. Bu hüceyrələrdə, X genin bir alleli qırılacaq.

Nokaut siçanın yaradılmasının ikinci mərhələsində, X genində nokaut mutasiyaya görə heteroziqot olan ES hüceyrələr qəbuledən (recipient) təbii-formalı siçanın blastosistinə keçirilir və sonra yalançı boğaz dişi siçana köçürülür (Şəkil 6-38). Nəticədə əmlə gələn yeni nəsil, transplant ES hüceyrələrdən və sahib hüceyrələrdən alınmış toxumalara malik olan ximerlər olacaq. Əgər ES hüceyrələr görünən marker əlamətlərə görə də homoziqotdurlarsa (məsələn, örtük rənginə görə), onda ES hüceyrələrin yaşadığı və proliferasiya edə bildiyi yeni ximer nəsil asanlıqla təyin oluna bilər. Sonra, nokaut mutasiyanın rüşeim xəttinə keçdiyini təyin etmək üçün ximer siçan, marker əlamətin başqa allelinə görə homoziqot olan siçanla cütləşdirilir. Nəhayət sonda, hər bir nokaut allelə görə heteroziqot olan siçanların cütləşdirilməsi nokaut mutasiyaya görə homoziqot yeni nəsili əmələ gətirəcək.

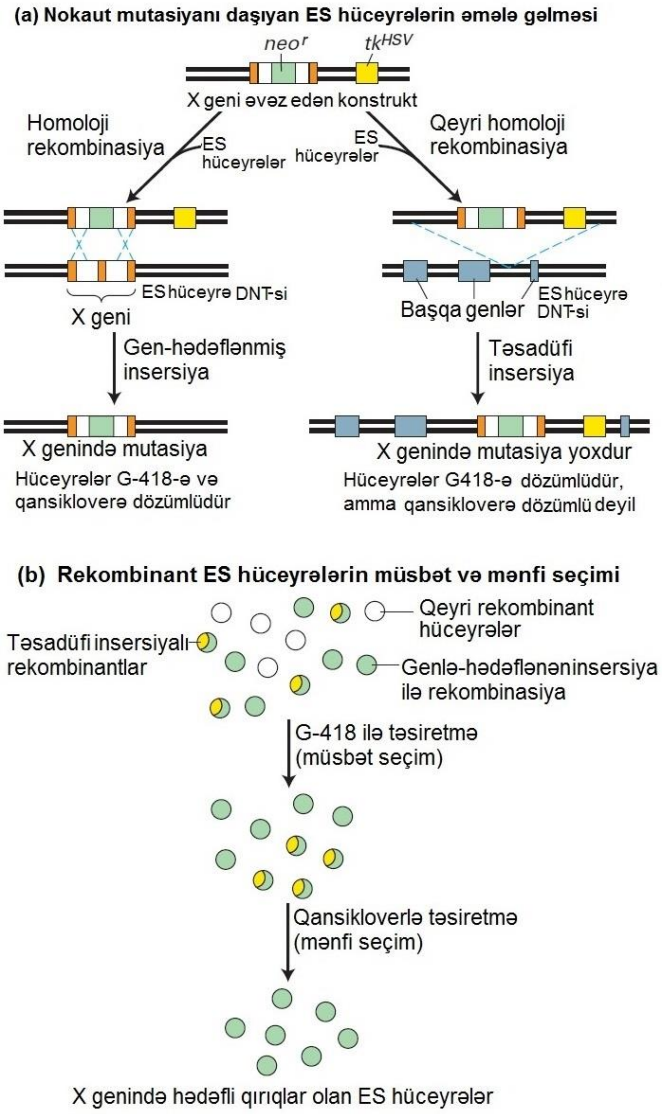
Bəzi insan xəstəliklərini oxşadan nokaut siçanın inkişaf etdirilməsi sistik fibroz ilə təsvir oluna bilər. Bölmə 6.4-də müzakirə olunan metodlarla, bu xəstəliyi əmələ gətirən resessiv mutasiyanın, xlorid kanalını kodlaşdıran *CFTR* adlandırılan gendə yerləşdiyi göstərilmişdir. Tədqiqatçılar, insanın klonlaşdırılmış normal tipli *CFTR* genindən istifadə edərək homoloji siçan genini ayırdılar və ardınca ona mutasiyanı daxil etdilər. Gen-nokaut metodu, sonra homoziqot mutant siçanı yaratmaq üçün istifadə olundu, onlar da simptomları (fenotipləri), o cümlədən, sistik fibrozlu insanlarda olduğu kimi, epitel hüceyrələrinin funksiyasındakı pozuntuları göstərdilər. Hal hazırda nokaut siçanlar, model sistem kimi genetik xəstəliklərin öyrənilməsində və ona qarşı səmərəli müalicələrin inkişaf etdirilməsində istifadə olunur.

Somatik Hücyrə Rekombinasiyası Spesifik Toxumalarda Genləri Fəalsızlaşdıra Bilir

Tədqiqatçılar tez-tez siçanın istənilən xüsusi bir toxumasında inkişafın xüsusi bir mərhələsində nokaut mutasiyanın təsirini yoxlamaq üçün maraqlanırlar. Amma, rüşeyim xətti ilə nokaut mutasiyaya malik olan siçanlar çoxsaylı müxtəlif toxumalarda qüsura malik ola bilərlər və ya lazım olan inkişaf mərhələsindən qabaq ölə bilərlər. Bu problemin həlli üçün, siçan genetikləri, xüsusi somatik hüceyrə tiplərində və ya inkişafın xüsusi bir zamanı daxilində hədəf genləri fəalsızlaşdırmaq kimi ağıllı bir metodu fikirləşib tapdılar.

Bu metodda, sayt-spesifik DNT rekombinasiya saytlarından (loxP *saytlar* adlanır) və onlar arasında rekombinasiyanı kataliz edən Cre fermentindən istifadə edilir. LoxP-*Cre rekombinasiya sistemi* P1 bakteriofaqdan alınmışdır, amma bu sayt-spesifik rekombinasiya sistemi siçan hüceyrələrinə keçirilərkən də işləyir. Bu metodun əhəmiyyətli xüsusiyyəti odur ki, Cre-nin ekspressiyası hüceyrə-tipi-spesifik promotor ilə tənzimlənir. Şəkil 6-39-də göstərilmiş prosedur ilə alınan *loxP*-Cre siçanında maraq geninin (X) fəalsızlaşması yalnız *cre* geninə nəzarət edən promotorun fəal olduğu hüceyrələrdə baş verir.

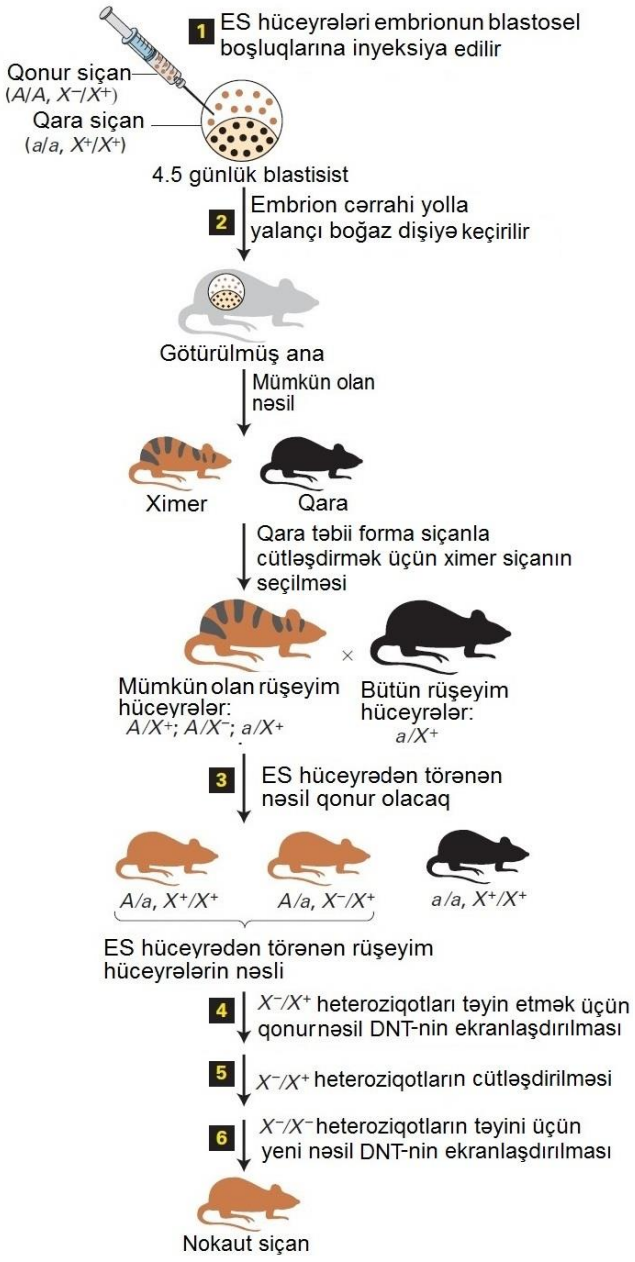
Bu metodun ilkin tətbiqi möhkəm dəlillərlə sübut etmişdir ki, xüsusi neyrotransmiter reseptoru dərk etmə və yaddaş üçün çox vacibdir. Əvvəlki farmokloloji və fizioloji tədqiqatlar göstərmişdilər ki, normal dərketmə beyinin bir hissəsi olan hipokampusda qlutamat reseptorların NMDA sinifini tələb edir. Amma, NMDA rerseptor subvahidini kodlaşdıran geni nokaut olunmuş siçan yeni doğulan anda (neonatal) öldü, bu da reseptorun dərketmədə rolunun analizinə mane oldu. Şəkil 6-39-dakı protokola riayət etməklə tədqiqatçılar, reseptor subvahidi geninin hipokampusda fəalsızlaşdırıldığı, amma başqa toxumalarda ekspressiya olunduğu siçanı yaratdılar. Bu siçan yetkinliyə qədər yaşadı amma, öyrənmək və yaddaş qüsurlarını biruza verdi və siçanın öz təcrübələrini yaddaşında kodlaşdıra bilmək qabliyyətində bu reseptorların rolunu təsdiq etdi.



Dominant-Neqativ Allellər Bəzi Genləri Funksionaol İngibirləşdirə Bilir

Bölmə 6.1-də qeyd olunduğu kimi, diploid orqanizmlərdə resessiv allelin fenotipik təsiri yalnız homoziqot fərdlərdə ekspressiya olunur, halbuki dominant allellər heteroziqotlarda ekspressiya olunur. Beləliklə, müvafiq fenotipin nümayiş olunması üçün fərd resessiv allelin iki nüxsəsinə malik olmalıdır, amma dominant allelin yalnız bir nüxsəsəi kifayət edir. Biz gördük ki, verilmiş resessiv nokaut mutasiayay görə homoziqot olan siçan ştammları eyni nokaut mutasiyaya görə heteroziqot olan fərdləri çarpazlaşdırmaqla yaradıla bilər (bax Şəkil 6-38). Amma, kulturada yetişdirilən heyvan hüceyrələri ilə eksperimentlərdə, mutant fenotipi yaratmaq üçün adətən genin hər iki nüsxəsini qırmaq çətin olur. Bundan başqa, genin hər iki nüsxəsinə görə mutasiya olunmuş ştammalrın yaradılmasındakı çətinlik çox hallarda oxşar funksiyaya malik olan müvafiq genlərin iştirakı ilə şiddətlənir, ona görə də müşahidə oluna bilən fenotipi aşkar etmək üçün onlar fəalsızlaşdırılmalıdır.

EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-37 Siçanın genlə-hədəflənmiş qırılmaya malik olan ES hüceyrələrinin ayrılması nokaut siçanın alınmasının ilk mərhələsidir. (a) Rekombinant DNT konstrukt rüşeyim sütun (ES) hüceyrəsinə keçirilərkən qeyri homoloji rekombinasiya yolu ilə təsadüfi insersiylar homoloji rekombinasiya yolu ilə genlə-hədəflənmiş insersiyadan daha tez-tez baş verir. X-geninin bir alleli (narıncı və ağ) qırılmış olan rekombinant hüceyrələr, G-418-ə qarşı dözümlülük verən *neo*^{r} qırılmış X genini (yaşıl) və homoloji rayonundan kənarda, herpes simpleks virusun *tk*^{HSV} timidin-kinaza genini (yaşıl) daşıyan rekombinant vektordan istifadə etməklə alına bilər. Virusun timidinkinazası, siçanın endogen fermentindən fərqli olaraq, qansiklovir nukleotid analoqunu monofosfat formaya çevirə bilir, bu isə sonra modifikasiya olunaraq ES hüceyrələrdə hüceyrə DNT-sinin replikasiyasını ingibirləşdirən trifosfat formaya çevrilir. Beləliklə, qansiklovir *tk*^{HSV} genini daşıyan rekombinant ES hüceyrələr üçün sitotoksikdir. Qeyri homoloji insersiyaya *tk*^{HSV} geni daxildir, homoloji insersiyaya isə bu gen daxil olmur, ona görə də, yalnız qeyri homoloji insersiyaya malik olan hüceyrələr qansiklovirə qarşı həssas olurlar. (b) Konstruktu götürə bilməyən və ya onu öz genomuna inteqrasiya edə bilməyən hüceyrələr belə sitotoksik birləşmələrə qarşı həssas olduğundan rekombinant hüceyrələr G-418 ilə təsir edilməklə seçilir. Sağ qalan rekombinant hüceyrələrə qansikloverlə təsir edilir. Yalnız, X genində qırılmaya hədəf olunmuş və ona görə də *tk*^{HSV} geninə və onunla müşayət olunan sititoksikliyə malik olmayan hüceyrələr sağ qalacaqlar. Bax S.L. Mansour et al., 1988, *Nature*, **336**:348.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-38 Qırılmış genə görə heterozigot olan ES hüceyrələr nokaut siçanı yaratmaq üçün istifadə olunurlar. Pillə 1: Maraq genində *(X)* nokaut mutasiyaya görə heterozigot olan və marker genin (burada qonur rəngdə, ***A***) dominant allelinə görə homozigot olan embrion sütun (ES) hüceyrələr, markerin resessiv allelinə görə (burada qara rəngdə, ***a***) homozigot olan 4-5 günlük rüşeymin blastosel boşluğuna transplantasiya olundu. Pillə 2: Sonra, erkən rüşeyim yalançı hamilə dişi fərdə keçirildi. ES törəməli hüceyrələrə malik olan bu yeni nəsil ximerlərdir, və qatışıq qara və qonur rənglərlə göstərilir. Pillə 3: Ximer siçan sonra, qara siçanla geriyə (bəkkross) çarpazlaşdırıldı, bu cütləşmədən alınan qonur nəsil onların rüşeyim xəttində ES-törəməli hüceyrələrə malikdirlər. Pillə 4 – 6. Kiçik miqdarda quyruq toxumasından ayrılmış DNT analizi qonur siçanların nokaut allelə görə heterozigotluğunu aşkar edə bilir. Bu siçanların öz aralarında çarpazlaşdırılması bəzi fərdləri qırılmış allelə görə homozigot yaradır, bu nokaut siçandır. Bax M.R. Capecchi, 1989, *Trends Genet.* **5**:70.

Müəyyən genlər üçün, nokaut homozigot mutantları yaradarkən dominant neqativ mutasiyanı daşıyan alleldən istifadə etməklə çətinlikdən yan keçmək olar. Bu allellər genetik dominant olurlar, belə ki, onlar hətta genin normal formasını daşıyan hüceyrələrdə belə, mutant fenotipi yaradırlar. Amma, dominant allelin başqa tiplərindən fərqli olaraq, dominant-neqativ allellər funksiyanın-itirilməsi mutasiyasına ekvivalent olan fenotipi yaradirlar.

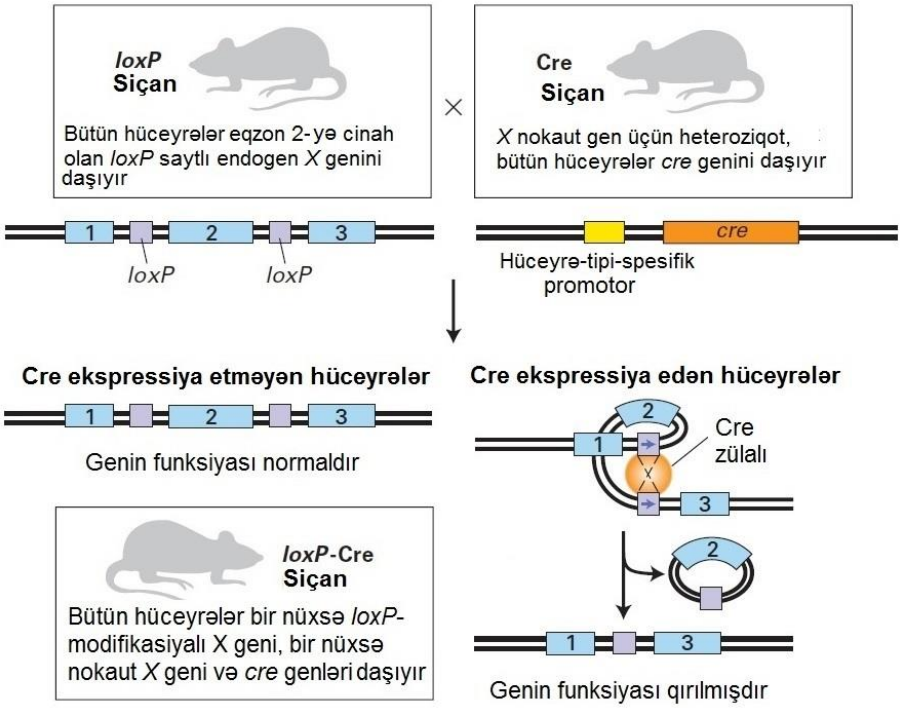
Faydalı dominant mənfi allellər müxtəlif genlər üçün müəyyən olunmuşdur və transfeksiya yolu ilə kultura olunan hüceyrələrə və ya rüşeyim yolu ilə siçana və ya başqa orqanizmlərə keçirilə bilərlər. Hər iki halda, keçirilmiş gen qeyri homoloji rekombinasiya yolu ilə genoma inteqrasiya edir. Bu cürə təsadüfi keçirilmiş genlər **transgenlər** adlanır və bunları daşıyan hüceyrələr və ya orqanizmlər **transgen orqanizm** və ya **hüceyrə** adlanır. Dominant-neqativ alleli daşıyan transgen adətən, elə yaradılır ki, allelə tənzimlənən promotorla nəzarət olunaraq mutant zülalın xüsusi bir zamanda xüsusi bir toxumalarda ekspressiyasına imkan verilsin. Yuxarıda qeyd olunduğu kimi, eqzogen DNT-nin qeyri homoloji rekombinasiya yolu ilə təsadüfi inteqrasiyası homoloji rekombinasiya yolu ilə daxil etməklə müqayisədə daha yüksək tezlikdə baş verir. Buna görə də, transgen siçanın yaradılaması səmərəli və irəliyə doğru bir prosesdir (Şəkil 6-40).

Dominant-neqativ allelin keçirilməsi ilə funksional fəalsızlaşdırıla bilən genlər arasında, GTP-azalar ailəsinə aid olan, kiçik (monomer) GTP-birləşdirən zülalları kodlaşdıran genləri göstərmək olar. Sonrakı bir neçə fəsildə bizim öyrənəcəyimiz kimi, bu zülallar (məsələn, Ras, Rac və Rab) hüceyrədaxili keçiricilər rolunu oynayırlar. Kiçik GTP-azaların GDP-birləşmiş formadan GTP-birləşmiş formaya çevrilməsi onların müvafiq quanin nukleotid mübadiləsi (GEF) faktoru ilə qarşılıqlı əlaqəsindən asılıdır. GEF zülallarla daimi birləşmiş mutant kiçik GTP-aza endogen təbii formalı GTP-azaların GTP-birləşmiş fəal formaya keçməsinin qarşısını alacaq (blok edəcək) və beləliklə onların keçirici funksiyasını ingibirləşdirəcək (Şəkil 6-41).

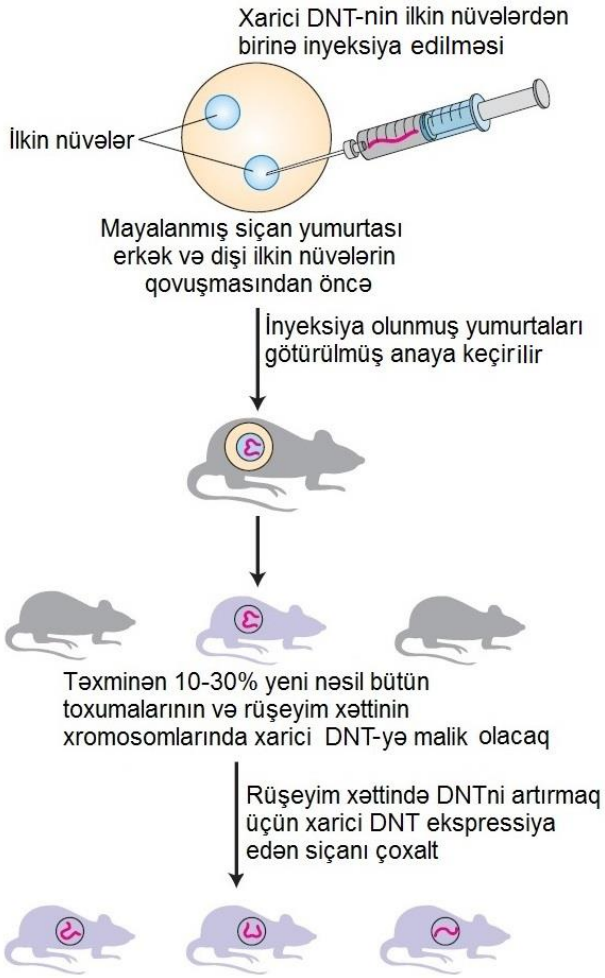
Müdaxilə RNT-si Müvafiq mRNT-ni Dağıtmaqla Genlərin Fəalsızlaşmasına Səbəb Olur

Müdaxilə RNT-si (RNA interference - RNAi) kimi məlum olan fenomen yəqin ki, spesifik genlərin funksiyasını ingibirləşdirmək üçün daha düzgün və sadə metoddur. Texniki cəhətdən bu yanaşma, yuxarıda genlərin pozulması üçün təsvir olunmuş metoddan sadədir. İlk dəfə həlqəvi qurdlarda *(C. elegans)* müşahidə olunan **müdaxilə RNT-si** (**RNTi**), iki-zəncirli RNT-nin fərqli ardıcıllığa malik olan mRNT-lərin deyil, məhz özünün müvafiq tək-zəncirli mRNT-sinin ekspressiyasını blok etmək qabliyyətinə aid edilir.

Fəsil 10-da təsvir olunduğu kimi, RNTi fenomenini eukaryot hüceyrələrin iki-zəncirli RNT-ni **kiçik ingibitor RNT-si kimi (siRNT)** məlum olan, qısa (23-nc uzunluqda) iki-zəncirli seqmqntlərə doğramaq kimi ümüumi qabliyyətinə əsaslanır. Bu reaksiyanı kataliz edən, **Dicer** kimi məlum olan RNT endonuk leaza fermenti bütün metazoanlarda tapılmışdır, amma maya göbələyi kimi sadə eukaryotlarda tapılmamışdır. Öz növbəsində, siRNT molekulları, *RISC* kimi məlum olan zülal kompleksi ilə



EKSPERIMENTAL ŞƏKİL 6-39 ***loxP*-Cre rekombinasiya sistemi spesifik hüceyrə tiplərində genləri nokaut edə bilir.** *loxP* saytı (tünd qırmızı) homoloji rekombinasiya yolu ilə hədəf geninin (X geni, mavi) əhəmiyyətli olan 2-ci eqzonunun hər iki tərəfinə keçirilmiş və *loxP* siçan yaradılmışdır. *loxP* saytları intronda olduğundan, onlar X genin funksyasını pozmurlar. Cre siçan, bir X nokaut allel geni və bekteriofaq P1-dən keçirilmiş hüceyrə-tipli-spesifik promotorla (sarı) əlaqəli *cre* genini (narıncı) daşıyır. *cre* gen, qeyri homoloji rekombinasiya yolu ilə siçanın genomuna daxil edilir və başqa genlərin funksiyasına təsir etmir. Bu iki tip siçanın çarpazlaşmasından alınan *loxP*-Cre siçanında Cre zülalları yalnız promotor fəal olan hüceyrələrdə istehsal olunacaq. Beləliklə, onlar *loxP* saytlar arasında Cre ilə kataliz olunan rekombinasiyanın baş verdiyi və nəticədə eqzon 2-nin aradan götürüldüyü hüceyrələrdir. Başqa allel konstitutiv X nokaut gen olduğundan, *loxP* saytlar arasındakı delesiya, Cre ekspressiya edən bütün hüceyrələrdə X genin funksiyasının tam itirilməsinə səbəb olur. Tədqiqatçılar müxtəlif promotorlardan istifadə edərək, müxtəlif hüceyrə tiplərində X genin nokaut olunmasının təsirini öyrənə bilirlər.



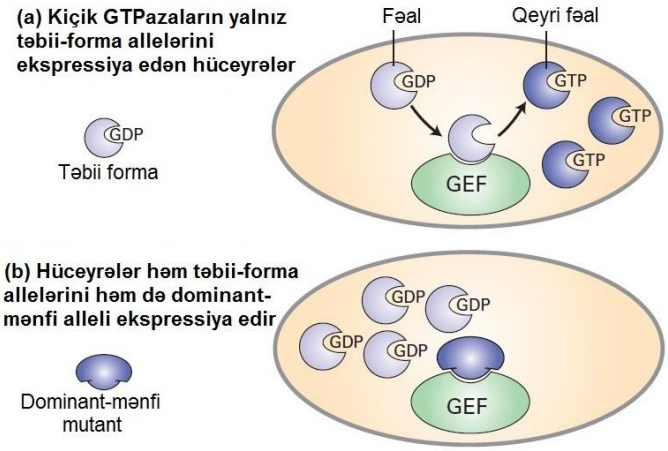
EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-40 Transgen siçan xarici genin siçan rüşeyim xəttinə təsadüfi inteqrasiyası yolu ilə yaradılır. İki pro-nüvədən (valideynlər tərəfindən verilmiş erkək və dişi haploid nüvələr) birinə inyeksiya olunmuş xarici DNT-nin diploid ziqotun xromosomlarına inteqrasiya olunmaq üçün yaxşı ehtimalı var. Transgen qeyri homoloji rekombinasiya yolu ilə qəbul edənin (recipient) genomuna inteqrasiya etdiyindən o, endogen genləri pozmur. Bax, R.L.Bringster et al., *Cell* **27:**223.

kataliz olunan reaksiyada mRNT molekullarının uyğun gələn ardıcıllıqla döğranmasına səbəb ola bilirlər. RISC, siRNT-nin bir zənciri ilə hədəf mRNT-nin ona komplementar olan ardıcıllığı arasında tanınmanın və hibridləşmənin vasitəçisidir (mediatorudur), uyğun olaraq, RISC kompleksindəki spesifik nukleazalar mRNT–siRNT hibridini dağıdır. Bu model əsasların cütləşməsindən asılı olduğundan və potensialına görə genlərin funksiyasının susdurulmasından asılı olduğundan, nukleolitik parçalanma yolu ilə komplementar mRNT həmişəlik dağıldığından RNTi-nin spesifikliyini nəzərə alır. Həm Dicer-in həm də RISC-in normal funksiyası mikro-RNT-lər və ya miRNT-lər kimi məlum olan kiçik endogen RNT molekulları vasitəsilə gen tənzimlənəsinə imkan verməkdir.

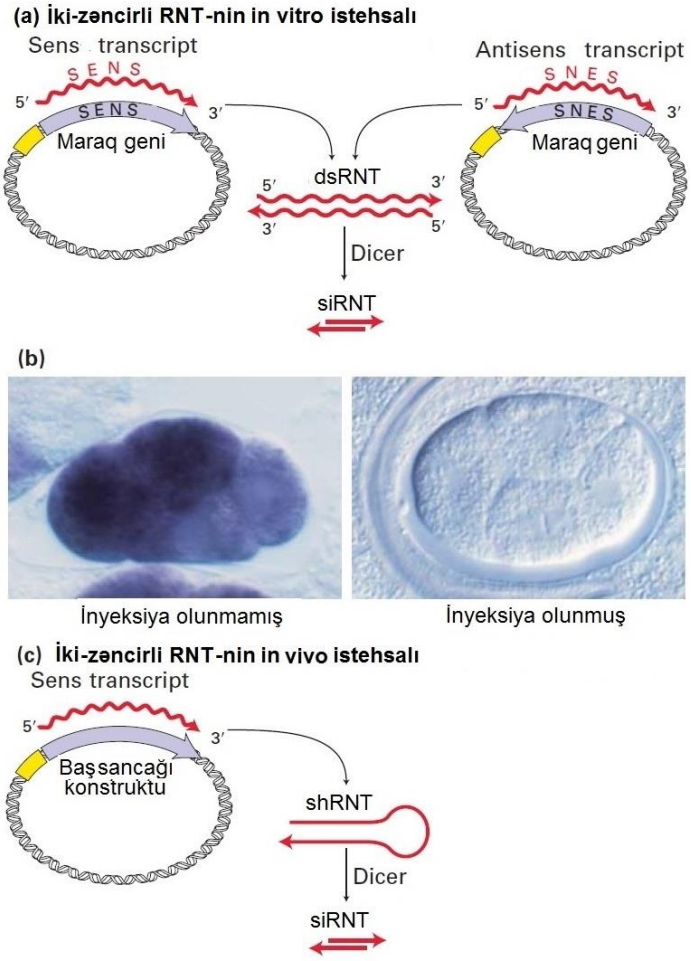
Tədqiqatçılar müəyyən ardıcıllıqla siRNT-ni yaratmaq üçün iki ümumi metoddan istənilən birini tətbiq etməklə *C. elegans* genini məqsədyönlü susdurmaq üçün mikro-RNT yolundan istifadə edə bilərlər. Birinci metodda, hədəf genin ardıcıllığına uyğun olan iki-zəncirli RNT (dsRNT), bu ardıcıllığın hər iki, sens və antisens nüsxələrinin in vitro transkripsiyası yolu ilə istehsal olunur (Şəkil 6-42a). Bu izRNT yetkin qurdun qonadına inyeksiya edilir, burada o, inkişaf edən rüşeymdəki Dicer vasitəsi ilə siRNT-yə çevrilir. siRNT

molekulları RISC kompleksl̇ə birlikdə müvafiq mRNT molekullarının sürətlə məhv olmasına səbəb olur. Nəticədə əmələ gəlmiş qurd, hədəf genin özünün dağıması ilə əmələ gələn fenotipə oxşar fenotipi nümayiş etdirir. Bəzi hallarda, xüsusi dsRNT-nin məhz bir neçə molekulunun hüceyrəyə daxil edilməsi kifayət edir ki, müvafiq mRNT-nin çox nüsxəsini fəalsızlaşdırsın. Şəkil 6-42b, daxil edilmiş dsRNT-nin *C. Elegans* rüşeymində müvafiq mRNT istehsalına müdaxilə etməsinin mümkünliyini göstərir. Bu eksperimentdə, mRNT-nin rüşeyimlərdə səviyyəsi, əvvəlldə qeyd olunduğu kimi, fluoressent nişanlanmış problardan istifadə etməklə in situ hibridləşmə yolu ilə təyin edilmişdir.

İkinci metod, spesifik ikizəncirli RNT-nin in vivo istehsalıdır. Bunu etmək üçün ən əhəmiyyətli yol, hədəf geninə uyğun olan hər iki, sens və antisesns ardıcıllıqların tandem seqmentlərini təşkil etmək üçün dizayn olunmuş sintetik genin ekspressiyasıdır (Şəkil 6-42c). Bu gen transkripsiya olunanda iki-zəncirli RNT, *kiçik sancaq RNT* və ya shRNT kimi məlum olan "saç sancağı" quruluş formasını alır. Sonra, shRNT Dicer ilə kəsilərək siRNT molekulunu əmələ gətirəcək. shRNT konstruktunun ekspressiyası üçün sintetik genlərin heyvan hüceyrəsi daxilinə keçirilməsində lentivirus ekspressiya vektorları xüsusən faydalıdır.



ŞƏKİL 6-41. Təbii formalı GTP-azanın funksiyasının dominant-neqativ mutant allelin təsiri ilə fəalsızlaşması. (a) Kiçik (monomer) GTP-azalar (bənövşəyi), onların GDP formadan GTP formaya keçməsini kataliz edən quanin nukleotid-mübadiləsi-faktoru (GEF) ilə qarşılıqlı təsir nəticəsində fəallaşırlar. (b) Kiçik GTP-aza genininin dominant-neqativ allelinin kultura olunmuş hüceyrəyə və ya transgen heyvana keçirilməsi, GEF-ə birləşən və onu fəalsızlaşdıran kiçik GTP-aznın ekspressiyasına səbəb olur. Nəticədə, kiçik GTP-azaların endogen təbii formaları qeyri fəal GDP-birləşmiş formada tələyə düşmüş olur. Beləliklə, vahid dominant-mənfi allel, iki resessiv funksiyanın-itirilməsi allelini daşıyan homoziqotlarda olduğuna oxşarr şəkildə, heteroziqotlarda funksiyanın-itirilməsi fenotipinin yaranmasına səbəb olur.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 6-42 Müdaxilə RNT-si (RNA interference – RNAi) *C. elegans* və başqa orqanizmlərdə genləri fəalsızlaşdıra bilir. (a) Xüsusi hədəf genin müdaxiləsi üçün iki-zəncirli RNT-nin (dsRNT) in vitro istehsalı. Genin kDNT klonundan və ya genom DNT-si seqmentindən alınmış kodlaşdırıcı ardıcıllığı, plazmid vektorda güclü promotorla yanaşı (bitişik) iki orientasiyada yerləşdirildi. RNT polimerazadan və ribonukleozid trifosfatlardan istifadə edərək hər iki konstruktun in vitro transkripsiyası sens orientasiya və antisens orientasiya komplementar olan çoxsaylı RNT nüsxələrini (mRNT ardıcıllığı ilə eyni olan) yaratdı. Uyğun şəraitlərdə, bu komplementar RNT molekulları hibridləşərək iki-zəncirli RNT (dsRNT) molekullarını yaradacaq. dsRNT hüceyrəyə keçiriləndə, o Dicer ilə doğranaraq siRNT-ləri yaradır. (b) *C. elegans* rüşeymində RNTi vasitəsi ilə *mex3* RNT-nin ekspressiyasının ingibirləşməsi (mexanizm üçün tekstə bax). Rüşeyimdə *mex3* RNT-nin ekspressiyası, rənglənmiş məhsulu (bənövşəyi) əmələ gətirən fermentlə əlaqəli olan bu mRNT-yə spesifik problardan istifadə etməklıə in situ hibridləşməsi yolu ilə yoxlanılmışdır. (*Solda*) Təbii-formalı embrion. (*Sağda*) İki-zəncirli *mex3* RNT-nin daxil edildiyi qurddan alınmış embrion. Hər biri dörd-hüceyrə-səviyyəsində olan rüşeyim təxminən ~50 μm uzunluqdadır. (c) Birbaşa hüceyrənin içərisinə yeridilən yaradılmış plazmid vasitəsi iki-zəncirli RNT-nin in vivo istehsalı. Sintetik gen konstruktu hədəf genin hər iki, sens və antisens ardıcıllıqlarının tandem düzülüşündən ibarətdir. O transkripsiya olunanda iki-zəncirli kiçik sancaq RNT (shRNT) formalaşır. shRNT Dicer ilə kəsilərək siRNT molekulunu yaradır. [(b) hissəsi Macmillan Publishers Ltd razılığı ilə Fire, A., "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*," *Nature*, 1998, **391**(6669):806-811-dən yenidən çap olunur; razılıəq Copyright Clearance Center, Inc. vasitəsilə alınmışdır.]

Hər iki RNTi metodu, orqanizmdə məlum olan hər bir genin fəalsızlaşdırılması üçün və nəyin yanılış getdiyini müşahidə etmək üçün sistematik tədqiqatlara daxil olurlar. Məsələn *C. elegans* ilə aparılan ilkin tədqiqatlarda RNT interferens 16700 genlə (genomun təxminən 86 faizi) 1722 görünə bilən anormal fenotipi əmələ gətirir. Funksional fəalsızlaşdırılması xüsusi anormal fenotipin yaranmasına səbəb olan genlər dəstlər şəklində quruplaşdırıla bilir, dəstin hər bir üzvi yəqin ki, eyni hadisələrə və ya siqnallara nəzarət edir. Dəstdə genlər arasındakı tənzimləyici münasibətlər məsələn, əzələ inkişafına nəzarət edən genlər, sonra işlənilib hazırlana bilər.

RNTi vasitəsilə gen fəalsızlaşdırılması *Drosophila*, müxtəlif tipli bitkilər, zebrafish, *Xenopus* qurbağa, siçan kimi başqa orqanizmlərdə də həyata keçirilmişdi və hal-hazırda bu orqanizmlər geniş-miqyaslı mövzuda RNTi ekranlaşdırmalara tətbiq olunurlar. Məsələn, məməlilərin kultura olunan hüceyrələrində ekspressiya olunan 10000 artıq müxtəlif genin RNTi ilə fəalsızlaşdırılması üçün lentivirus vektorlar dizayn olunub yaradılmışdır. Fəalsızlaşdırılmış genlərin funksiyası lentivirus vektorla transfeksiya olunmuş hüceyrə klonlarının artmasımda və ya morfologiyasında olan qüsurlardan qiymətləndirilə bilər.

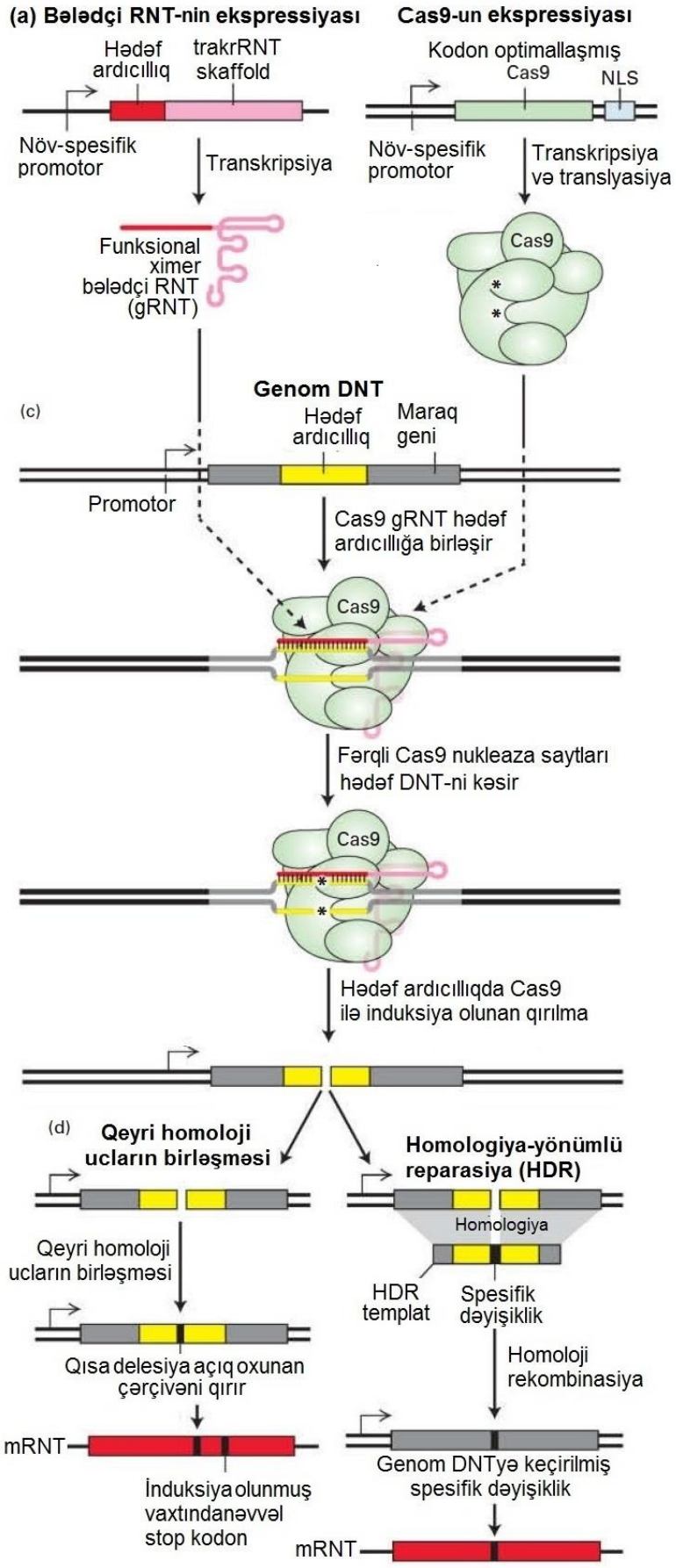
Yaradılmış CRISPR-Cas9 Sistemlər Dəqiq Genom Redaktəsinə İmkan Verir

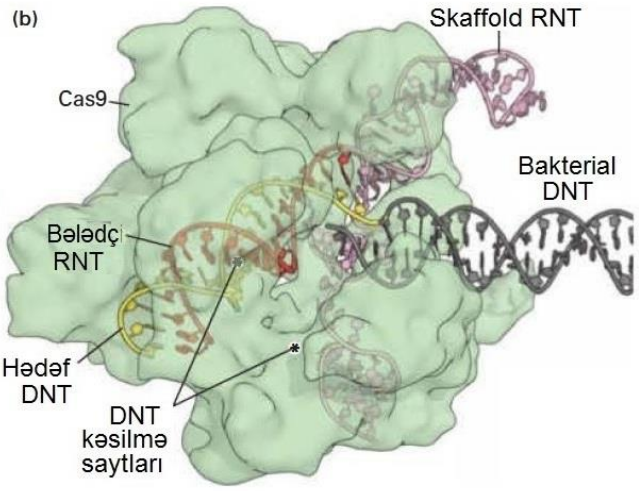
Son zamanlar yaradılmış metod genom DNT ardıcıllıında *genom redaktəsi* adlanan proseslə dəqiq dəyişikliklər aparmağa imkan verir. Bu metod bakterial hüceyrə genomunu xarici DNT-yə qarşı, məsələn, faq DNT-sinə qarşı müdafiə etmək üçün təkamül prosesində yaranıb inkişaf etmiş təbii mexanizmə əsaslanır. CRISPR (*c*lustered *r*egularly *i*nterspaced short *p*alindromic *r*epeats – müntəzəm fasilələrlə qruplaşdırılmış qısa palindrom təkrarlar) adlanan bu mexanizm ardıcıllığı oxunan bakterial genomun yarısından çoxunda tapılmış tandem təkrarlanan ardıcıllıqların maraqlı düzülüşünə görə adlandırılmışdır. Təkrarlanan ardıcıllıqların düzülüşü *Cas* (**CRISPR-assosasiyalı**) genlər adlanan və nukleazaları kodlaşdıran genlərə oxşarlıq göstərən genlərin konservativ dəsti ilə cinahdan əhatə olunur.

CRISPR ardıcıllığın funksiyasının başa düşülməsində bir sıçrayış, düzülüşdə təkrarlanan ardıcıllıq elementlırinin bir dəstinin çox hallarda faq genomundakı qısa seqmentlərə uyğun gəlməsinin müşahidə olmasından meydana gəlmişdir. Daha sonra göstərilmişdir ki, CRISPR element və onunla assosasiyada olan Cas genlər bakterial hüceyrələrə faq DNT-ni CRISPR düzülüşündəki təkrarlanan ardıcıllığa uyğun gələn dəqiq saytlardan kəsmək qabliyyəti verir. CRISPR vasitəsilə faqa qarşı immunitetin qazanılması iki mərhələdə baş verir. Birinci mərhələdə, faqla yoluxmuş CRISPR sistemini daşıyan bakteriofaq DNT-ni qısa seqmentlərə döğrayır və bu seqmentləri CRISPR düzülüşünə elə yerləşdirir ki, onlar yüksək konservativ təkrarların aralarında fasilələrlə səpələnsinlər. İkinci mərhələdə, CRISPR düzülüşün transkripsiyası və alınmış RNT-nin prosessinqi yetkin ikitərəfli RNT molekullarını əmələ gətirir, bu da konservativ təkrarlanan ardıcıllıqları və faqdan-törənən aralıq speyser-ardıcıllığı daşıyır. Təkrar ardıcıllıq müdaxilə (interference) kompleksini əmələ gətirərkən Cas zülallarına birləşmək üçün skafolt yaradan, **tracrRNT *(trans-activating crispr RNA)*** adlanan ikinci RNT molekulu ilə birləşir və faqdan-törənən ardıcıllıq əsas cütlərini əmələ gətirmək yolu ilə kompleksi spesifik hədəf ardıcıllığına yönəldir. Spesifik DNT ardıcıllığına hədəf olunduqdan sonra, Cas zülallardakı nukleaza hədəf DNT molekulunun hər iki zəncirini bələdçi ardıcıllıqla əsas-cütü əmələ gətirən rayona bitişik olan saytdan kəsir.

Hərçənd ki, CRISPR elementləri yalnız prokariot orqanizmlərdə tapılmışdır, alimlər guman edirlər ki, bələdçi RNT və Cas zülallar ekspressiya olunarsa eukariot hüceyrələrdə də öz funksiyalarını yerinə yetirə biləcəklər. CRİSP-in virtual olaraq istənilən hüceyrə tipində fəaliyyət göstərməsini uyğunlaşdırmaq üçün nukleaza Cas9 və yaradılmış bələdçi RNT-dən ibarət olan minimal sistem yaradılıb inkişaf etdirilmişdir (Şəkil 6-43a). Gas9 genom redaktəsi üçün lazım olan bütün fermentativ fəallıqlara, o cümlədən DNT-nin hər zənciri üçün biri olan iki ayrı endonukleaza fəallıqlarına –malikdir. Bələdçi RNT iki rayondan təşkil olunub: birinci iki-zıncirli saç sancağı quruluşunu əmələ gətirən iki komplementar ardıcıllıqdan yaradılıb, Gas9-a birləşmək üçün dizayn olunub, ikinci rayon isə 20 nukleotid uzunluqdadır, hədəfləmə fəallığını təmin edir və genom DNT-dəki spesifik sayta çox uyğun gəlmək üçün dizayn olunub. Cas9 və bələdçi RNT hər ikisi qəbuledən hüceyrədə ekspressiya olunanda, Cas9 hər iki DNT zəncirini bələdçi RNT ardıcıllığının müəyyən etdiyi xromosomal saytdan doğrayacaq (Şəkil 6-43b,c). Göstərilmişdir ki, Cas9 və spesifik bələdçi RNT-ni ekspressiya edən plazmid ilə transfeksiya *Drosophila*, *C. elegans*, danio balığı, siçan və insan kimi müxtəlif orqanizmlərdən ayrılmış hüceyrələrdə spesifik DNT kəsilmələrinin yaranmasına səbəb olur. Orqanizmin rüşeyim xəttini modifikasiya etmək üçün xüsusən səmərəli yol Cas9 mRNT-nin və bələdçi RNT-nin siçan ziqotuna mikroinyeksiyası ilə başlandı. Nəticədə spesifik hədəf ardıcıllığında meydana gələn iki-zəncirli qırılma, adətən qeyri-homoloji ucların qovuşması adlanan proseslə sərbəst DNT uclarını geriyə, bir yerə liqasiya edən fermentlər dəsti ilə bərpa olunur (Şəkil 6-43d). Adətən kəsilmə saytında bir neçə əsas cütü silinir, çünki ucların qovuşması reaksiyası başa çatmazdan öncə nukleazalar sərbəst DNT uclarından əsasları silə bilir. Əgər doğranma saytı genin kodlaşdırıcı ardıcıllığı daxilindədirsə, bir neçə əsasın silinməsi çərçivənin sürüşməsi mutasiyasını əmələ gətirir, beləliklə hədəf olunan geni fəalsızlaşdırır.

Genom redaktəsinin bu metodunun əhəmiyyətli incəliyi, doğranma saytına cinah olan ardıcıllığa uyğun gələn, adətən 100 nukleotid uzunluqda olan DNT seqmentinin əlavə edilməsidir. Homoloji DNT mövcud olduqda, sərbəst uclar homoloji rekombinasiya yolu ilə əlavə edilmiş DNT seqmentindən istifadə edərək bərpa oluna bilər (bax Şəkil 6-43d). Doğranma saytını təyin etmək üçün bələdçi RNT-nin müvafiq dizaynı ilə və əlavə edilmiş homoloji DNT seqmenmtində müvafiq ardıcıllıq dəyişilməsinin tətbiqi ilə hədəf DNT-də dəqiq bir-əsaslı dəyişilmələr edilə bilər. Genom redaktəsi metodunun bu dramatik nümayişində, qamma-kristallin geni olan *Crygc* genində kataraktın əmələ gəlməsinə səbəb olan bir-əsaslı mutasiya mutant siçan ziqotuna Cas9 mRNT-nin, mutasiya saytında doğranmanı istiqamətləndirən bələdçi RNT-nin və döğranma saytına sarınan və təbii-forma *Crygc* ardıcıllığına malik olan 90 nukleotid uzunluqda DNT seqmentinin inyeksiya edilməsi ilə geriyə, təbii-formaya bərpa edilmişdir (fəsilin-açılış şəkilinə bax). Mutant allelin redaktəsi bələdçi RNT-nin yalnız bir





ŞƏKIL 6-43 Yaradılmış CRISPR-Cas9 sistemdən istifadə edərək tək-nukleotidli mutasiya genoma daxil edilə bilər. (a) Hədəf hüceyrənin genomu iki-zəncirli DNT endonukleaza Cas9 və bir zəncirli bələdçi RNT-nin ekspressiya olunması ilə modifikasiya oluna bilər. Bu komponentlətin ekspressiyasına Cas9 və bələdçi RNT genlərini daşıyan plazmidləri transfeksiya etməklə və ya Cas9 mRNT-ni və bələdçi RNT-ni birbaşa inyeksiya etməklə nail olmaq olar. Bələdçi RNT iki hissədın təşkil olunub: saç-sancağı skafolt quruluşda bükülən ardıcıllıq, bu Cas9 ilə birləşir və genomda hədəf saytına uyğun olan, təxminən 20 nukleotid uzunluqda ardıcıllıq. Bu komponentlərin ekspressiyası Cas9 və bələdçi RNT genlərini daşıyan plazmidlərin transfeksiyası yolu ilə və ya Cas9 mRNT-nin və bələdçi RNT-nin birbaşa inyeksiyası yolu ilə nail oluna bilər. (b) Cas9 ilə birləşmiş bələdçi RNT kompleksi bələdçi RNT-nin komplementar genom DNT ardıcıllığı ilə əsas cütü əmələ gətirəməsilə genoma hədəf olunur. Bu quruluş Cas9-un iki fərqli nukleaza fəallığı mərkəzinin bələdçi RNT ilə heterodupleks əmələ gətirən hədəf DNT-nin hər iki zəncirini kəsməsinə imkan verir. (c) Bu mexanizmlə, həm Cas9 həm də spesifik gen ardıcıllığını hədəf etmək üçün dizayn olunmuş ikitərəfli bələdçi RNT-nin ekspressiyası hədəf genin ikizəncirli kəsilməsinə səbəb olur. (d) DNT-nin kəsilməsi, adətən kəsilmə saytından kiçik sayda əsasları uzaqlaşdıran, qeyri homoloji ucların qovuşması (NHEJ) prosesi ilə bərpa (reparasiya) olunur. Əgər kəsilmə kodlaşdırıcı ardıcıllıqda baş verirsə NHEJ bir qayda olaraq çərçivə sürüşməsi mutasiyası ilə genin funksiyasını fəalsızlaşdırır. Əgər, kəsilmə saytına cinahdan olan ardıcıllığa sarınan, ~100 nukleotid uzunluqda tək-zəncirli DNT seqmenti Cas9 mRNT və bələdçi RNT ilə birlikdə inyeksiya olunarsa kəsilmiş DNT homoloji rekombinasiya yolu ilə bərpa oluna bilər (homologiya ilə istiqamətlənən reparasiya, HDR). Bu mexanizmlə tək bir nukleotid dəyişilməsi bərpa olunan genom DNT-nə daxil edilə bilər. [(b) hissəsi C. Anders et al., 2014, *Nature* **513**:569-573, PDB ID 4un3-dən.]

əsas cütü ilə fərqlənən mutant və təbii-forma allellərini fərqləndirməsini tələb etdiyindən bu eksperiment həmçinin CRISPR-Cas9 hədəfləmənin çox əhəmiyyətli selektivliyini də işıqlandırdı.

6.4 bölməsində biz gördük ki, insanın genetik xəritələşdirilməsi və onunla bağlı olan tədqiqatlar böyük sayda genetik variantları identifikasiya etdi, bunlardan çoxu tək nukleotid polimorfizmini təmsil edir və insanlarda bu və ya digər irsi xəstəlikləri əmələ gətirir. Məməlilərin rüşeyim xəttində tək-əsaslı dəyişilməni əmələ gətirmək üçün CRISPR-Cas9 sisteminin istifadə olunma imkanları siçan kimi yaxşı nəzarət olunan eksperimental orqanizmlərdə ekvivalent alllelərin yaradılmasını mümkün edir.

6.5 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSIYALARI

Eukaryotlarda Xüsusi Genlərinin Funksiyasının Fəalsızlaşdırılması

- Gen klonlaşdırıldıqdan sonra onun in vivo normal funksiaysı barədə əhəmiyyətli sübut, genin mutasiya olunmasının müşahidə olunan fenotipik təsirlərindən alına bilər.
- Mayada genlər, homoloji rekombinasiya yolu ilə seçilə bilən marker genlərin təbbii-formalı genin bir allelinə daxil eilməsi və homoziqot mutantı yaratmaqla qırıla bilər. Belə heteroziqot spor əmələ gətirəndə, həyat qabliyyətinə malik olmayan iki haploid sporları yaradacaq (bax Şəkil 6-36).
- Maya geni, hüceyrələr qlükoza mühitinə keçirilərkən, genin transkripsiyasını dayandırmaq üşün *GAL1* promotordan istifadə etməklə nəzarət olunan şəkildə fəalsızlaşdırıla bilər.
- Siçanda, modifikasiya olunan genlər homoloji rekombinasiya yolu ilə rüşeyim xəttində onların genomdakı orjinal yerinə keçirilməklə nokautlar yaradıla bilər (bax Şəkil 6-38 və 6-39). Nokaut siçanlar, insanın sistik fibroz kimi genetik xəstəlikləri üçün modeli təmin edə bilər.
- *loxP*-Cre rekombinasiya sistemi, spesifiki toxumada geni nokaut olunmuş siçanın yaradılmasına imkan verir.
- Transgen hüceyrələri və ya orqanizmləri yaradanda eqzogen DNT qeyri homoloji rekombinasiya yolu ilə sahibin (hüceyrənin) genomuna inteqrasiya edir (bax Şəkil 6-40). Bu yolla dominant-neqativ allelin intraduksiyası funksional cəhətdən geni, onun nukleotid ardıcıllığını dəyişmədən fəalsızlaşdıra bilir.
- Çox orqanizmlərdə, o cümlədən həlqəvi qurd *C. elegans*-da iki-zəncirli RNT, bütün mRNT molekullarının dağılmasını eyni ardıcıllıqla həyata keçirir (bax Şəkıı 6-42). RNTi kimi (müdaxilə RNT-si) məlum olan bu fenomen, genlərin quruluşunu dəyişmədən onların funksional fəalsızlaşmasını təmin edən çox güclü və spesifik vasitədir.
- Xarici DNT-ni dəqiq hədəf edib dağıtmaq üçün yaranan, CRISPR kimi məlum olan bakterial sistem çox orqanizmlərdə genom DNT-sinə spesifik dəyişikliyin daxil edilməsini mümkün etmək üçün istifadə olunmağa uyğunlaşdırılmışdır. Xromosom DNT-sinin spesifik saytdan CRISPR-Cas9 vasiyəsi ilə kəsilməsi doğranma saytında qısa silinmə ilə nəticələnir. Əgər dizayn olunmuş müvafiq DNT seqmenti transfeksiya yolu ilə təmin edilirsə, nöqtəvi mutasiyalar kimi spesifik DNT dəyişilmələri doğranma saytına keçirilə bilər (bax Şəkil 6-43).

Açar Sözlər

allellər
CRISPR
DNT kitabxanası
DNT klonlaşdırması
DNT mikroarrey
dominant
əlaqə (linkage)
fenotip
funksional komplementasiya
gen nokautu
genomiks
genotip
heteroziqot
hibridləşmə
homoziqot
in situ hibridləşmə
klon
komplementar DNT-lər (kDNT-lər)
mutagen
mutasiya
müdaxilə RNTsi (RNTi)
Norzerin blottinq
nöqtəvi mutasiya
plazmidlər
polimeraza zəncirvari reaksiya (PZR)
rekombinant DNT
rekombinasiya
resessiv
restriksiya fermentləri
Sauzerin blottinq
seqreqasiya
təbii forma (wild type)
transfeksiya
transformasiya
transgenlər
vektor

Konsepsiyalara Baxış

1. Genetik mutassiyalar mürəkkəb hüceyrə və inkişaf proseslərinin mexanizmində bilikləri təmin edə bilir. Genetik mutasiyalar üzrə sizin analizləriniz, hər hansı bir xüsusi mutasiyanın dominant və ya resesiv olmasından asılı olaraq necə fərqlənməlidir?

2. Temperatura-həsas mutasiya nədir? Nəyə görə temperature-həssas mutasiyalar genlərin funksiyasının açılmasında faydalıdır?
3. İki mutasiyanın eyni gendə və ya müxtəlif gendlərdə olduğunu aşkar etmək üçün komplementasiya analizlərinin necə istifadə edildiyini təsvir edin. Nədən komplementasiya analizlərinin dominant mutasiya ilə işləmiyəcəyini izah edin.
4. Ceyn, qabda yetişdirilən mayanın normal ağ koloniyalar əvəzinə qırmızı koloniyaları yaradan mutant ştammını ayırdı. Mutant geni təyin etmək üçün o, lizin seçim markerinə malik olan DNT kitabxanası ilə funksional komplementasiyadan istifadə etmək qərarına gəlir. Məlum olmayan gen mutasiyalarından başqa, mayada leysin və lizin amin turşularının sintezi üçün tələb olunan genlər çatışmır. Mayanın kitabxana plazmidlərini götürməsinə əmin olmaq üçün, Ceyn onları hansı mühitdə yetişdirəcək? Kitabxana plazmidinin mayada mutasiyanı həyata keçirdiyini o necə biləcək?
5. DNT liqaza və restriksiya fermentləri DNT klonlaşdırılmasında əhəmiyyətli rol oynayırlar. Necə olur ki, restriksiya fermentlərini istehsal edən bakteriya öz DNT-sini doğramır? Restriksiya fermentləri saytlarının ümumi xüsusiyyətlərini təsvir edin. DNT-ni restriksiya fermenti ilə kəsdikdə hansı üç tip DNT sonluqları əmələ gələ bilir? DNT liqaza ilə hansı reaksiya kataliz olunur?
6. Bakterial plazmidlər çox vaxt klonlaşdırma vektoru rolunu oynayırlar. Plazmid vektorun əhəmiyyətli xüsusiyyətlərini təsvir edin. Klonlaşdırma vektoru kimi plazmidlərin hansı istifadə sahəsi və üstünlükləri var?
7. DNT kitabxanası, hər biri klonlaşdırma vektoruna keçirilmiş müxtəlif DNT fraqmentlərinə malik olan klonların toplusudur (kolleksiyasıdır). kDNT və genom DNT kitabxanaları arasındakı fərq nədən ibarətdir? Fərz edin ki, siz insert mənbəyi kimi kitabxanadan istifadə edərək yalnız neyronlarda ekspressiya olunan X genini vektora klonlaşdırmaq istəyirsiz. Əgər sizin ixtiyarınızda (imkanınızda) aşağıdakı kitabxana varsa (dəri hüceyrələrindən alınmış genom kitabxanası, dəri hüceyrələrindən alınmış kDNT kitabxanası, neyronlardan alınmış genom kitabxanası, neyronlardan alınmış kDNT kitabxanası) onlardan hansını istifadə edərdiniz və niyə görə?
8. 1993-cü ildə, Kari Mullis PZR reaksiyasını ixtira etdiyinə görə kimya üzrə Nobel Mükafatını aldı. PZR reaksiyasının hər bir tsiklindəki üç mərhələni təsvir edin. Nəyə görə termostabil DNT polimerazanın (məsələn, *Taq* polimeraza) aşkar edilməsi PZR-in inkişaf etdirilməsi üçün çox əhəmiyyətli olmuşdur?
9. Sauzerin və Norzerin blottinq molekulyar biologiyada nuklein turşularının hibridləşməsinə əsaslanan çox güclü vasitədir (metodlardır). Bu metodlar hansı xüsusiyyətinə görə eynidirlər? Onlar nə ilə fərqlənirlər? Hər iki blottinq metodu üçün spesifik tətbiq nümunələrini verin.
10. Bir sıra xarici zülallar bakteriyada və məməlilərin hüceyrəsində ekspressiya olunular. Xarici genin ekspressiyası üçün tələb olunan rekombinant plazmidlərin əhəmiyyətli xüsusiyyətlərini təsvir edin. Xarici zülalın təmizləməsini asanlaşdırmaq üçün onu necə modifikasiya etmək olar? Bakteriyalarla müqayisədə məməlilərin hüceyrələrində zülalların ekspressiyasının üstünlükləri nədən ibarətdir?
11. Norzerin blottinq, RT-PZR və mikroarreylər genlərin ekspressiyasının analizində istifadə oluna bilirlər. Laboratoriya maya hüceyrələrini, onların iki müxtəlif şəkərin, qlükozanın və qalaktozanın olduğu mühitdə bitməsini müqayisə etməklə öyrənir. Bir tələbə, *HMG2* geninin bu iki müxtəlif şərait altında ekspressiyasını müqayisə edir. O, hansı metod(ları)u və nə üçün istifadə edə bilər? Başqa bir tələbə, xromosom 4-də olan, təxminən 800 yaxın bütün genlərin ekspressiyasını müqayisə etmək istəyir. O, hansı metod(ları)u və nə üçün istifadə edə bilər?
12. Yeni aşkar olunmuş genə uyğun olan zülalın oxşarlığını (identikliyini) təyin etməyə, çox zaman bu gen üçün toxuma ekspressiyasının modelini bilmək kömək edir. Məsələn, tədqiqatçılar tapdıalr ki, *SERPINA6* adlandırılan gen qara-ciyərdə, böyrəkdə və mədəaltı vəzidə ekspressiya olunur, amma başqa toxumalarda olunmur. Tədqiqatçılar hansı metoddan istifadə edərk hansı toxumanın bu geni ekspressiya etdiyini tapa bilərlər?
13. DNT polimorfizimləri DNT markerlər kimi istifadə oluna bilər. SNP və STR polimorfizimlər arasındakı fərqləri təsvir edin. Bu markerlər DNT-xəritələşdirmə tədqiqatlarında necə istifadə oluna bilərlər?
14. Necə olur ki bəzən, əlaqə-müvazinətsizliyi ilə xəritələşdirmə genin yerləşməsini klassik əlaqə-xəritələşməyə nisbətən daha yüksək rezolyusiya ilə təmin edir?
15. Genetik əlaqə tədqiqatları adətən "xəstəlik" geninin xromosomda yerləşmə vəziyyətini yalnız təxmini tapır. Ekspressiya analizləri və DNT ardıcıllığının analizləri əlaqə xəritələşdirmə yolu ilə təyin edilmiş rayon daxilində xəstəlik geninin yerini tapılmasına necə kömək edir?
16. Siçanda genomun selektiv şəkildə modifikasiya olunmaq imkanları siçanın genetikasında inqilab oldu. Xüsusi genetik lokusda nokaut siçanın yaradılması prosesini təsvir et. *loxP*-Cre sistem genin şərti nokaut olunmasında necə istifadə oluna bilər? Nokaut siçanın əhəmiyyətli tibbi tətbiqi nədən ibarətdir?
17. Gen ardıcıllığını dəyişmədən genin funksional fəalsızlaşdırılması üçün iki metod – dominant-neqativ mutasiya və müdaxilə RNTsi-dir (RNTi). Bu metodların hər birinin genin ekspressiyasını necə ingibirləşdirə biləcəyini təsvir edin.

İstinadlar

Genləri Öyrənmək Və İdentifikasiya Etmək Üçün Mutasiyaların Analizi

Hartwell, L. H. 1967. Macromolecular synthesis of temperature-sensitive mutants of yeast. *J. Bacteriol.* **93**:1662.

Nüsslein-Volhard, C., and E. Wieschaus. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila. Nature* **287**:795–801.

Tong, A. H., et al. 2001. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* **294**:2364–2368.

DNT-nin Kolonlaşdırılması və Xaraktaerizasiyası

Maniatis, T., et al. 1978. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. *Cell* **15**:687–701.

Nasmyth, K. A., and S. I. Reed. 1980. Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:2119–2123.

Nathans, D., and H. O. Smith. 1975. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annu. Rev. Biochem.* **44**:273–293.

Gen Ekspressiyasını Öyrənmək Üçün Klonlaşdırılımış DNT Fraqmentlərindən Istifadə

Pellicer, A., et al. 1978. The transfer and stable integration of the HSV thymidine kinase gene into mouse cells. *Cell* **41**:133–141.

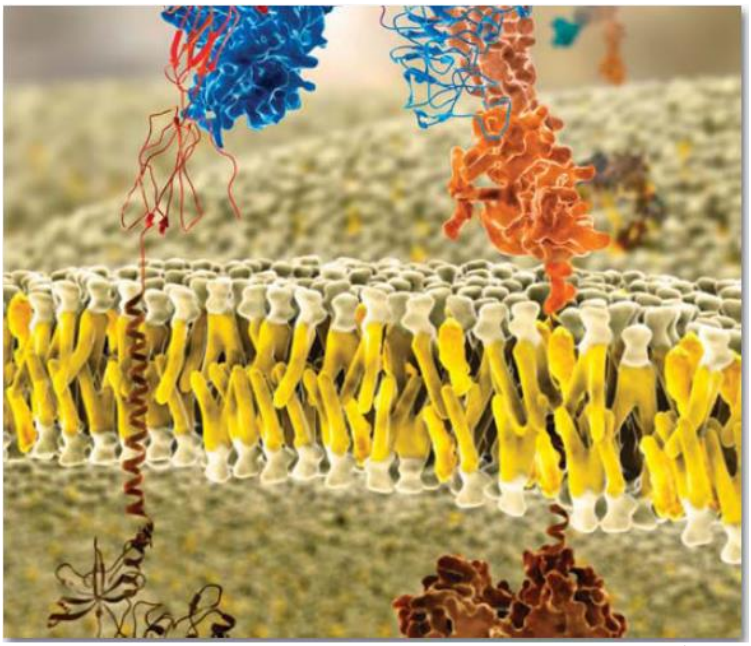
Saiki, R. K., et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487–491.

İnsanın Xəstəlik Genlərinin Taplması və Müəyyənləşdirilməsi

Botstein, D., et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Genet.* **32**:314–331.
Donis-Keller, H., et al. 1987. A genetic linkage map of the human genome. *Cell* **51**:319–337.
Hastbacka, T., et al. 1994. The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transporter: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping. *Cell* **78**:1073.

Eukaryotlarda Xüsusi Genlərin Fəaliyyətini Fəallaşdırmaq

Capecchi, M. R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**:1288–1292.
Fire, A., et al. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806–811.
Jinek, M., et al. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**:816–821.
Zamore, P. D., et al. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**:25–33.
Zimmer, A. 1992. Manipulating the genome by homologous recombination in embryonic stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **15**:115



Lipid ikiqatlısının membran zülalları ilə birləşmiş molekulyar modeli. İnteqral membran zülalları fərqli egzoplazma, sitozol və membrana-dolanan domenlərə malikdir. Burada göstərilən hüceyrə metobalizmini tənzimləyən insulin reseptoru zülallarıdır [Ramon Andrade 3Dcincia/Science Photo Library.]

FƏSİL 7

Biomembranların Quruluşu

Membranlar hüceyrə quruluşunun və fəaliyyətinin çox aspektlərində iştirak edirlər**. Plazma membranı** hüceyrə sərhədlərini müəyyənləşdirir və hüceyə daxilini xaricindən ayırır. Membranlar eukariotlarda nüvə, mitoxondri, lizosomlar kimi hüceyrədaxili orqanoidləri də təyin edirlər. Bu biomembranlar eyni əsas arxitekturaya malikdirlər – daxilində zülallar yüklənmiş ikiqat fosfolipid təbəqə (Şəkil 7-1). Suda həll olan maddələrin əksəriyyətinin membranın bir tərəfindən digər tərəfinə köməksiz keçməsinə mane olaraq fosfolipid ikiqatlısı keçiricilik baryeri kimi xidmət edir, hüceyrənin və ya orqanoidin daxili və xarici tərəfləri arasında xarakterik fərqlərin saxlanılmasına kömək edir, öz növbəsində, membrana yüklənmiş zülallar membrana xüsusi funksiyalar verir, məsələn maddələrin bir tərəfdən digər tərəfə tənzimlənən daşınması. Hər bir hüceyrə membranı özünəməxsus zülallar dəstinə malikdir, bu da onlara çoxsaylı müxtəlif funksiyaları yerinə yetirməyə imkan verir.

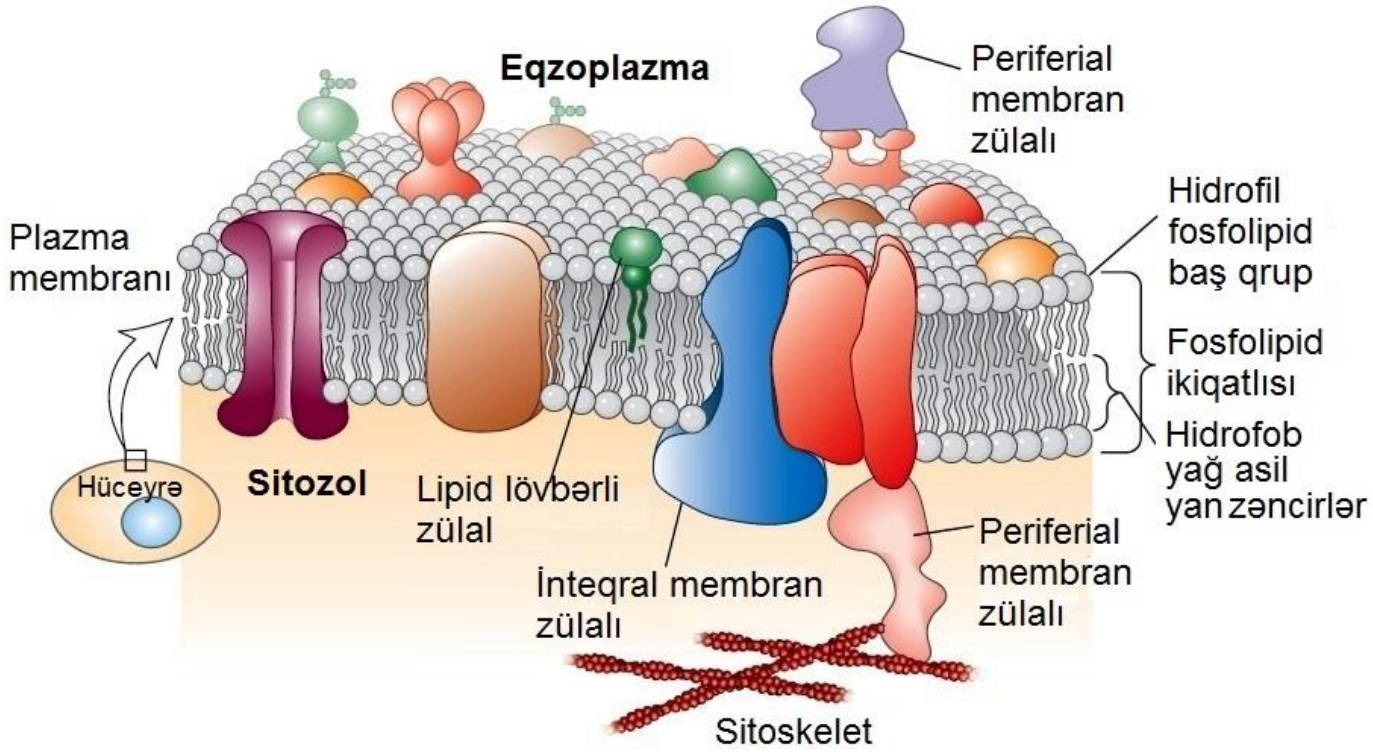
Ən kiçik və sadə hüceyrələr olan prokariotlar, təxminən 1-2 μm uzunluqdadırlar və tək bir plazma membranı ilə əhatə olunublar, çox hallarda, onlar daxili membranla-məhdudlaşan subkompartmentə malik olmurlar (bax Şəkil 1-11). Amma, bu sadə plazma membranları yüzlərlə müxtəlif tipli zülallara malik olurlar, onlar da hüceyrə funksiyasının ayrılmaz (inteqral) hissəsidirlər. Məsələn, bu zülallardan bəziləri, ATP sintezini və DNT replikasiyasının inisiasiyasını kataliz edir. Başqalarına çoxsaylı müxtəlif tipli **membran nəqliyyat zülalları** daxildir, bunlar da spesifik ionların, şəkərlərin, amin turşularının və vitaminlərin keçirici olmayan fosfolipid ikiqatlısından kəsib hüceyrəyə keçməsini və xüsusi metabolik məhsulların hüceyrədən çıxmasını mümkün edirlər. **Reseptor zülalları** plazma membran zülalları olub hüceyrəyə ətrafında olan kimyəvi siqnalları tanıyaraq ona cavab reaksiyası kimi öz metabolizmini və ya gen ekspressiya profilini dəyişməsinə imkan verir.

Eukariotlar, tərkibində müxtəlif funksiyaları həyata keçirən müxtəlif zülalları, o cümlədən membran transport, hüceyrədə siqnal ötürən və hüceyrəni toxumalara birləşdirən zülallar yerləşmiş plazma membranına da malikdirlər. Bundan əlavə, prokariotlardan çox-çox böyük olan eukariot hüceyrəər müxtəlif daxili membranla birləşmiş orqanoidlərə də malikdirlər (bax Şəkil 1-12). Hər bir orqanoid membranı, hüceyrədə oz xarakterik fəaliyyətini yerinə yetirməyə imkan verən unikal zülallar dəstinə malikdir, məsəlın, ATP əmələ gəlməsi (mitoxondrilərdə) və DNT sintezi (nüvədə). Çoxsaylı plazma membran zülalları, hüceyrə membranına mexaniki möhkəmlik vermək üçün sitozolu kəsib keçən filament zülalların sıx şəbəkəsindən təşkil olunmuş **sitoskeletin (hüceyrə skelet sistemi)** komponentlərinə birləşirlər. Bu qarşılıqlı əlaqələr hüceyrə üçün, öz formalarını saxlamaqdan ötrü və müxtəlif hüceyrə hərəkətlərini həyata keçirməkdən ötrü çox əhəmiyyətlidir.

QISA İCMAL

7.1 Lipid ikiqatlısı: Tərkibi və Quruluşunun Təşkili
7.2 Membran Zülalları: Quruluşu və Əsas Fəaliyyətləri
7.3 Fosfolipidlər, Sfinqolipidlər və Xolesterin: Sintezi və Hüceyrədaxili Hərəkıtləri (Daşınmaları)

Hüceyrədəki quruluş roluna baxmayaraq, membranlar sərt quruluş deyillər. Onlar, üçölçülü quruluşa malikdirlər, əyilə və qatlana bilirlər, zülalları və lipidləri bir yerdə saxlayan zəngin qeyri kovalent əlaqələr hesabına yenə də öz bütövlüklərini qoruyub saxlayırlar. Bundan başqa, membran müstəvisi daxilində fərdi lipid və zülalların əhəmiyyətli dərəcədə hərəkətliliyi vardır. Biomembranların, ilk dədə 1970-ci illərdə tədqiqatçılar tərəfindən irəli sürülən *maye mozaik modelinə* əsasən, lipid ikiqatlısı bəzi hallarda özünü iki-ölçülü maye kimi aparır, bu zaman fərdi lipid molekulları bir-birindən keçərək hərəkət etmək qabliyyətinə və eləcədə yerində fırlanmaq qabliyyətinə malikdirlər. Bu cürə mayelilik və dəyişkənlik orqanoidlərə onların yalnız tipik formalarını almasına imkan vermir, eyni zamanda membranların qovuşmaq və tumurcuqlamaq kimi, məsələn yoluxmuş hüceyrələrdən virusların buraxılması (Şəkil 7-2a) və Qolci kompleksinin daxili hüceyrə membranlarının qovucuqlar şəkilində tumurcuqlayaraq sitozola buraxılması (Şəkil 7-2b) və sonra öz tərkibindəkiləri bir orqanoiddən digərinə daşımaq üçün başqa membranlarla qovuşması kimi (Fəsil 14) dinamik xüsusiyyətlərinə imkan verir.



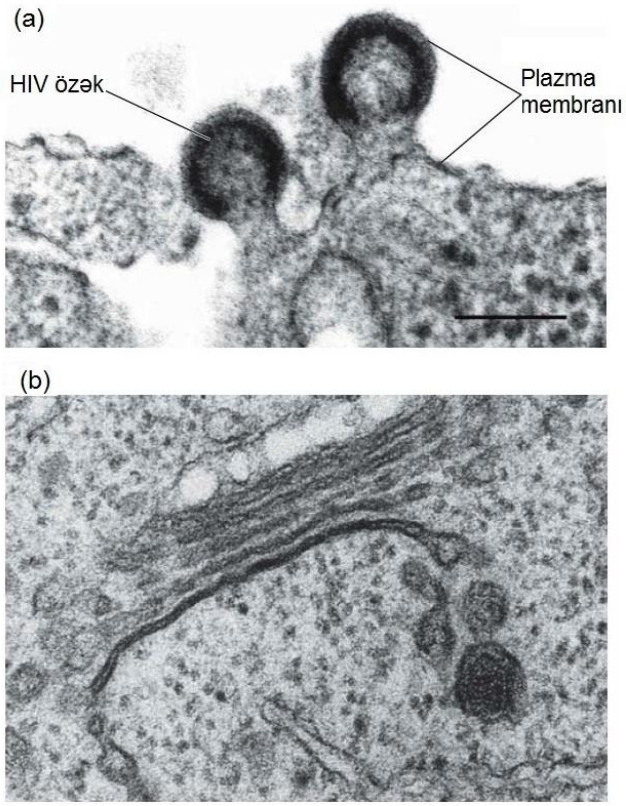
ŞƏKİL 7-1 Biomembranların maye mozaik modeli. Fosfolipidlərin ~3 nm qalınlıqda ikiqatlısı hüceyrə membranının əsas arxitekturasını təşkil edir, membran zülalları hər bir hüceyrə membranına onun unikal funksiyalarını verir. Fərdi fosfolipidlər yana (lateral) hərəkət edə bilirlər və membran müstəvisində fırlanırlar, membrana zeytun yağında olduğu kimi, mayeyəbənzər sabitlik (daimilik) verirlər. Fosfolipidlər arasında və fosfolipidlərlə zülallar arasında qeyrikovalent qarşılıqlı əlaqələr membranın möhkəmliyinə və güclülüyünə kömək edir, eyni zamanda lipid ikiqatlısının hidrofob özəyi suda-həllolan madələrin bir tərəfdən digər tərəfə köməksiz keçməsinə mane olur. İnteqral (transmembran) zülallar lipid ikiqtlısını kəsib keçeərək ona sarınır və tez-tez hallarda dimerləri və yüksək dərəcədə oliqomerləri əmələ gətirirlər. Lipid-lövbərli zülallar, kovalemt birləşmiş karbohidrogen zəncirlə bir vərəqdə birləşmişdir (hörülmüşdür). Periferiyal zülallar membranda əsasən spesifik qeyri kovalent əlaqələr vasitəsi ilə inteqral zülallara və ya membran lipidlərinə birləşirlər. Plazma membranındakı zülallar sitoskeletlə də geniş əlıaqə yaradırlar. Bax D. Engelman görə, 2005, *Nature* **438**:578-580.

Biz biomembranları yoxlamaq üçün tədqiqatlarımızı onların lipid tərkibini nəzərə alaraq başladıq. Bu molekullar yalnız membranın formalarına və fəaliyyətinə təsir etmir, eyni zamanda zülalların membranda lövbər salmasına kömək edir, membran zülallarının fəallığını modifikasiya edir və siqnalların sitoplazmaya ötürülməsini həyata keçirir. Biz sonra membran zülallarının quruluşuna baxırıq. Bu zülalların çoxu, fosfolipid ikiqatlısının karbohidrogen özəyinə gömülmüş (batmış) böyük seqmentlərə malikdirlər və biz belə membran zülallarının əsas siniflərinə diqqət yetirəcəyik. Nəhayət, sonda biz fosfolipid və xolesterin kimi lipidlərin hüceyrədə necə sintez olunmasına və əksər membranlara və orqanoidlərə necə paylanmasına baxacağıq.

7.1 Lipid İkiqatlısı: Tərkibi və Quruluşunun Təşkili

Biz 2-ci fəsildə öyrəndik ki, fosfolipidlər biomembranların əsas quruluş bloklarıdır. Membranlarda ən çox yayılan fosfolipidlər fosfoqliseridlərdir (bax Şəkil 2-20), amma bizim bu fəsildə görəcəyimiz kimi, fosfolipidlərin çoxsaylı müxtəlif tipləri vardır. Bütün fosfolipidlər **amfipatik** molekullardır – onlar, çox müxtəlif kimyəvi xassəyə malik olan iki seqmentdən təşkil olunublar: **hidrofob** xassəyə malik olan və sudan uzaqlaşan (“sudan qorxan”), yağ-turşusu əsaslı karbohidrogen “quyruq”dan və güclü **hidrofil** xassəyə malik olan (“suyu sevən”) və həmişə su molekulları ilə əlaqə yaratmağa meyilli

olan polyar “baş qrupdan”. Fosfolipidlərin bir-biri ilə və su ilə qarşılıqlı əlaqəsi geniş şəkildə biomembranların quruluşunu təyin edir.



ŞƏKİL 7-2 Eukariotik hüceyrə membranları dinamik quruluşlardırlar. (a) HIV-lə yoluxmuş hüceyrənin elektron mikrofotosu, HIV zərrəciklərinin kultura mühitinə tumurcuqladıqlarını göstərir. Virus hüceyrədən tumurcuqlayıb çıxan kimi o hüceyrənin plazma membranından törənmiş və virus zülalları ilə zəngin olan membranla örtülü olur. (b) Qolci kompleksinin tumurcuqlayan qovucuqlarla qalaqlanmış (stacked) membranları. Bu membranların qeyri-müntəzəm formasına və qövslülüyünə diqqət yetirin. [(a) hissəsi W. Sundquist and U. von Schwedler, University of Utah; (b) hissəsi Biology Pics/Science Source.]

Biomembranlar fosfolipidlərdən başqa, az miqdarda başqa amfipatik lipidlərə, məsələn qlikolipidlər və xolesterin kimi lipidlərə də malikdirlər, bunlar membranın fəaliyyətinə əhəmiyyətli dərəcədə kömək edirlər. Biz əvvəlcə təmiz fosfolipid ikiqatlısının quruluşuna və xassələrinə baxacağıq, sonra isə təbii hüceyrə membranının tərkibini və xassələrini müzakirə edəcəyik. Biz sonra verilmiş membranın dəqiq lipid tərkibinin onun fiziki xassələrinə necə təsir etdiyinə baxacağıq.

Fosfolipidlər Spontan Şəkildə Ikiqatlını Əmələ Gətirirlər

Fosfolipidlərin, onların qarşllıqlı təsirlərini nizamlayan amfipatik xassəyə malik olması biomembranların quruluşunda kritik əhəmiyyətə malikdir. Fosfolipidlərin suspenziyası mexaniki yolla su məhluluna dağıdılanda, fosfolipidlər üç quruluşdan birinə aqreqasiya edirlər: sferik **misellər** və ya **liposomlar**, yaud iki molekul qalınlığında olan vərəqşəkilli **fosfolipid ikiqatlıları** (Şəkil 7-3). Təmiz fosfolipidlərlə və ya zülal əlavə olunmamış fosfolipidlərin qatışığı ilə əmələ gələn quruluş tipi bir sıra faktorlardan, o cümlədən hidrofob quyruqlarda olan yağ turşusu zəncirlərinin uzunluğundan, onların doyma dərəcəsindən (başqa sözlə, C─ C və C═C əlaqələrin sayından) və temperaturdan asılıdır. Hər üç quruluşda, hidrofob təsir (bax Fəsil 2) yağ turşusu zəncirinin aqreqasiyasına səbəb olur və quruluşun “özəyindən” su molekullarını sıxışdırıb çıxarır. Misellər təbii fosfolipidlərdən nadir hallarda əmələ gəlir, onların yağ turşusu zəncirləri misellərin daxilinə yerləşmək üçün əsasən həddən artıq böyük olurlar. Amma, əgər fosfolipid quyruğu əmələ gətirən iki yağ asil zəncirindən biri, fosfolipaza fermenti ilə təsir edərkən əmələ gəldiyi kimi, hidrolizlə olunmaqla lizofosfolipidi əmələ gətirərək uzaqlaşdırılarsa misellər formalaşır. Su məhlulunda, çox istifadə olunan detergentlər və sabunlar özünü kiçik podşibnikdəki şarlar kimi aparan miselləri əmələ gətirirlər, bununla da sabuna sürüşkən hiss və sürtgü yağı xassələri verir.

Spontan şəkildə hüceyrədə mövcud olan tərkibin fosfolipid qatışığı simmetrik fosfolipid ikiqatlısını əmələ gətirir. Bu lamellar quruluşda hər bir fosfolipid qatı *vərəqlər* (*leaflet*) adlanır. Hər bir vərəqdə hidrofob yağ asil zəncirləri özlərini ikiqatlının mərkəzində sıx şəkildə bir-yerdə düzləndirməklə su ilə öz əlaqələrini minimuma endirirlər, təxminən 3-4 nm qalınlıqda hidrofob özəyi əmələ gətirirlər (Şəkil 7-3b). Bu qeyri polyar quyruqların sıx şəkildə bükülməsi karbohidrogen zəncirləri arasındakı van-der-Vaals qarşılıqlı əlaqələr ilə stabilləşir. İon və hidrogen rabitələri fosfolipid polyar baş qrupların bir-biri ilə və su ilə qarşılıqlı əlaqələrini stabilləşdirir. Fosfolipidlıərin polyar baş qrupuna möhkəm şəkildə birləşən osmium tetraoksidlə rənglənmiş hüceyrələrin nazik kəsiklərinin elektron mikroskopiyası ikiqat quruluşu aşkar edir (Şəkil 7-3a). Osmium tetraoksidlə rənglənmiş tək bir membranın çarpaz kəsikləri dəmir yolu relslərinə bənzəyir: aralarında təxminən 2 nm bərabər olan işıqlı sahə (hidrofob quyruqlar) ilə iki nazik qara xət (rənglənmiş baş qrup kompleksləri).

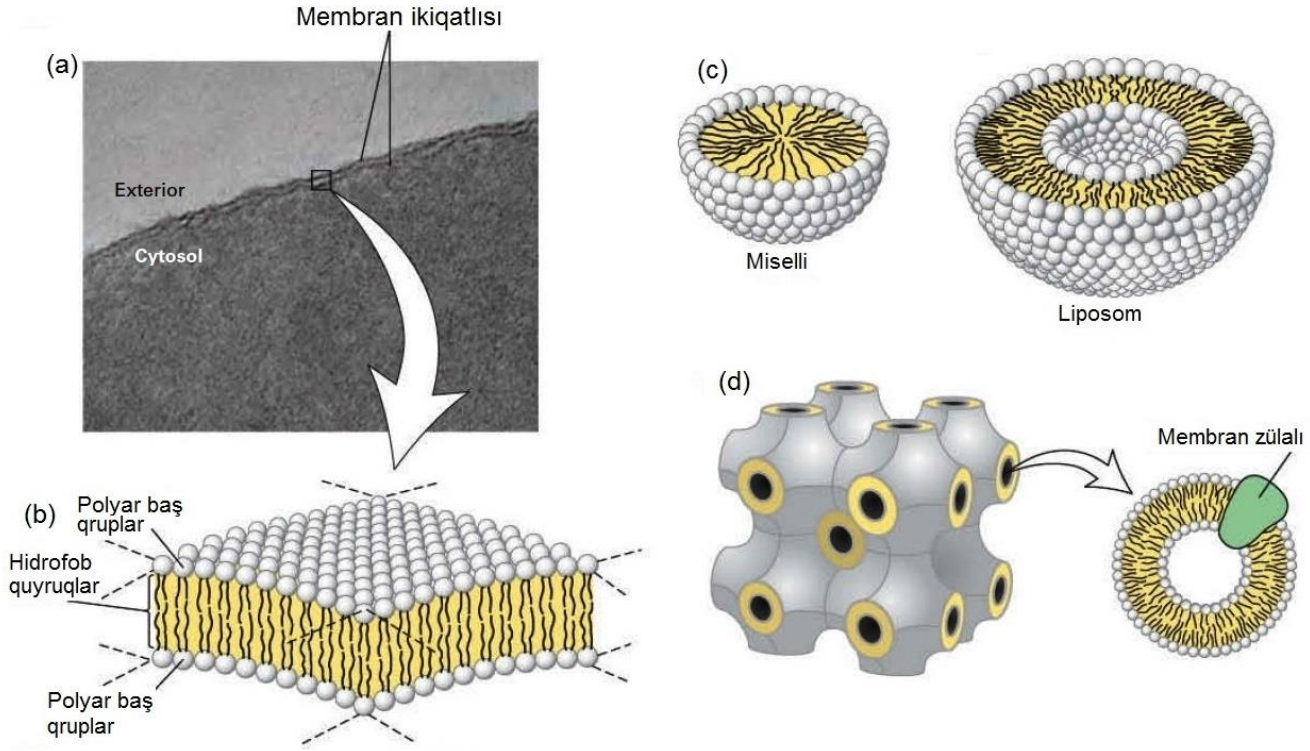
Fosfolipid ikiqatlısı təxminən mikrometrlərdən (μm) millimetrlərə (mm) qədər uzunluqda və ya enlikdə olan qeyri məhdud ölçüdə ola bilir və on millionlarla fosfolipid molekullarına malik ola bilir. Fosfolipid ikiqatlısı deməık olar ki, bioloji membranların əksəriyyətinin əsas quruluş vahididir. Onun hidrofob özəyi suda-həll olan maddələrin çoxunun membranın bir tərəfindən digər tərəfinə kəsib keçməsinə mane olur. Hərçənd ki, biomembranlar başqa molekullara da (məsəlın, xolesterinə, qlikolipidlərə, zülallara) malikdirlər, iki su məhlulunu ayıran və beləliklə də keçiricilik baryeri rolunu oynayan məhz onun fosfolipid ikiqatlısıdır. Beləliklə, lipid ikkqatlısı hüceyrə kompartmentlərini təyin edir və hüceyrənin daxili hissəsinin xarici aləmdən ayrılmasına imkan verrir.

Yuxarıda qeyd olunan üç quruluş lipidlərin su mühitində ala biləcəyi yeganə formalar deyildir. Lipidlərin qeyri adi konfiqurasiyaları başqa-halda-çətin-kristallaşa bilən membran zülallarının, o cümlədən G zülallarla-cütləşən reseptorların təmiz lipid mühitində kristalloqrafik analizlərini təmin edilməsində mühüm rol oynamışdır (Şəkil 7-3d).

Fosfolipid İkiqatlısı Daxili Su Mühitini Əhatə Edən Germetik Kompartmenti Yaradır

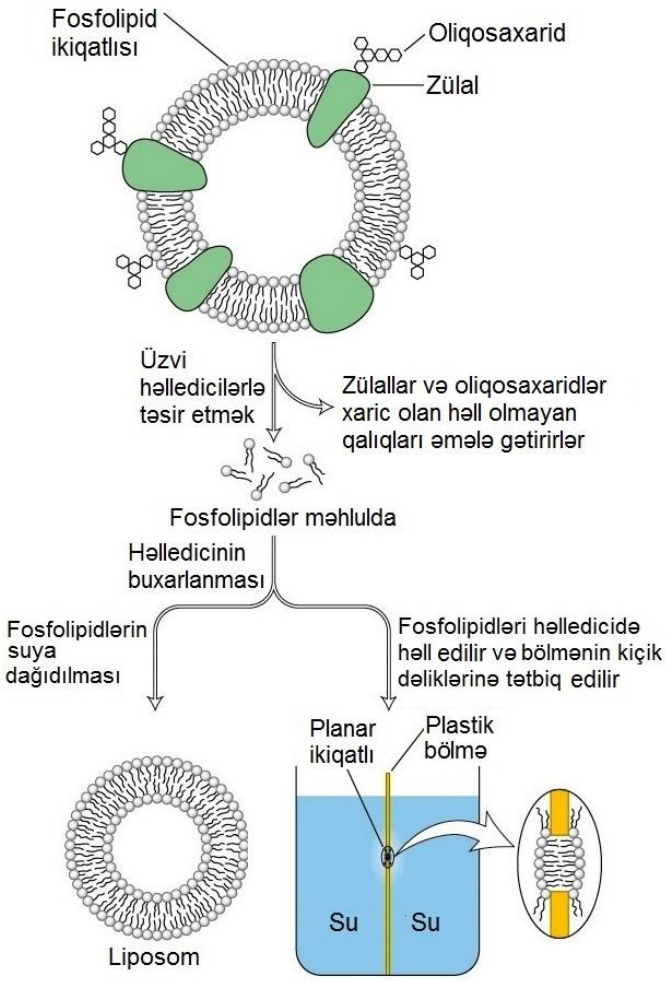
Fosfolipid ikiqatlısı sadə bir metodla, ya kimyəvi təmiz fosfolipidləri istifadə etməklə ya da tərkibi hüceyrə membranında tapılmış lipid qatışığını istifadə etməklə laboratoriyada yaradıla bilər (Şəkil 7-4). Belə sintetik ikiqatlılar üç əhəmiyyətli xassəni özündə saxlayır. **Birinci,** onlar virtual olaraq suda həll olan məhlullara qeyri keçiricidirlər (hidrofobluq), yəni lipid ikiqatlısından asanlıqla diffuziya edə bilmirlər. Bu məhlullara duzlar, şəkərlər və suyun özü aid olmaqla digər əsas kiçik hidrofil molekullar daxildirlər. Lipid ikiqatlısının **ikinci** xassəsi onun stabilliyidir. Yağ asil zəncirlər arasında hidrofob və van-der-Vaals qarşılıqlı təsirlər ikiqat quruluşun daxili bütövlüyünü qoruyub saxlayır. Baxmayaraq ki, xarici su mühiti ion gücünə və pH-na görə geniş şəkildə dəyişilə bilir, lakin lipid ikiqatlısı öz xarakterik arxitekturasını qoruyub saxlamaq gücünə malikdir. **Üçüncü**, bütün fosfolipid ikiqatlıları spontan şəkildə qapalı bağlı kompartmentləri yarada bilirlər, burada daxildəki su mühüti xaricdəki su mühitindən ayrılır. Fosfolipid ikiqatlının, Şəkil 7-3b-də göstərildiyi kimi, karbohidrogen özəyi ilə su məhluluna məruz qalan"kənarı" qeyri stabil olmalıdır, əgər açıq qalmış yağ asil yan zəncirləri su molekulları ilə yanaşı olmasaydılar, başqa yağ asil zəncirləri ilə əhatə olunsaydıalr energetik cəhərdən daha çox stabil vəziyyətdə olmalıydırlar. Beləliklə, su məhlulunda fosfolipid ikiqatlının vərəqləri öz kənarlarını spontan şəkildə qapayırlar, mərkəzində olan sulu kompartmenti örtən sferik ikiqatlını əmələ gətirirlər. Şəkil 7-3c-də təsvir olunan liposom, çarpaz kəsiklərdə baxılmış belə quruluş üçün bir nümunədir.

Fosfolipid ikiqatlının bu fiziki-kimyəvi xassələri hüceyrə membranları üçün çox böyük əhəmiyyət kəsb edir: hüceyrədə açıq qalmış yağ asil karbhidrogen zəncirli "kənar"a malik olan membran olmur. Bütün mümbranlar əsas arxitekturasına görə liposomlara bənzəyən qapalı kompartmenti əmələ gətirirlər. Hüceyrənin bütün membranları hüceyrəni tam əhatə etdiklərinəı görə və ya daxili kompartmenti əhatə etdiklərinə görə onlar *daxili üzə* (kompartmentin daxilinə tərəf baxan üz) və xarici üzə (ətraf mühitə tərəf baxan üz) malikdirlər. Daha çox hallarda, biz hüceyrə membranının iki səthini **sitoplzmatik üz** və **eqzoplazmatik üz** kimi adlandırırıq. Bu nomenklatura, Şəkil 7-5 və 7-6-da göstərildiyi kimi, müxtəlif membranlarda üzlərin topoloji ekvivalentliyinin vurğulanması üçün faydalıdır. Məsələn, plazma membranının eqzoplazmatik üzü sitozoldan kənara, hüceyrəxarici məkana və ya xarici mühitə istiqamətlənmişdir və hüceyrənin xarici hüdudlarını təyin edir.



ŞƏKİL 7-3 Biomembranların ikiqat quruluşu. (a) Osmium tetraoksidlə rənglənmiş eritrosit membranının nazik kəsiyinin elektron mikrofotosu. Membranın xarakterik "dəmir yolu"görünüşü, fosfolipid membranların ikiqat quruluşuna tam uyğun olan iki polyar qatın mövcud olduğunu göstərir. (b) Fosfolipid ikiqatlısının hidrofob yağ turşusu asil quyruqlarını sudan qorumaq üçün polyar qrupların üzü xaricə yerləşmiş sxematik interpretasiyası. Hidrofob effekt və yağ turşusu asil quyruqlar arasındakı van-der-Vaals qarşılıqlı əlaqələr ikiqatlının yığılmasını idarə edir (Fəsil 2). (c) Fosfolipidlərin suda dispersiyasından əmələ gəlmiş iki başqa quruluşun çarpaz-kəsik görünüşü. Kürə şəkilində olan miselli tamamilə yağ turşusu zəncirlərindən təşkil olunmuş hidrofob daxilə malikdir, kürə şəkilində olan liposom su maye (akvatik) mərkəzi əhatə edən fosfolipid ikiqatlısından təşkil olunmuşdur. (d) müəyyən şərait altında lipidlər daha da başqa təşkil formalarını ala bilirlər. Burada göstərilənlər, başqa halda kristallaşması çətin olan membran zülallarının kristallarının əmələ gəlməsinə kömək edən, yüksək dərəcədə müntəzəm təkrarlanan quruluş lipidlərin kub fazalarıdır. [(a) hissəsi Warren Rosenberg/Fundamental Photographs – dan.

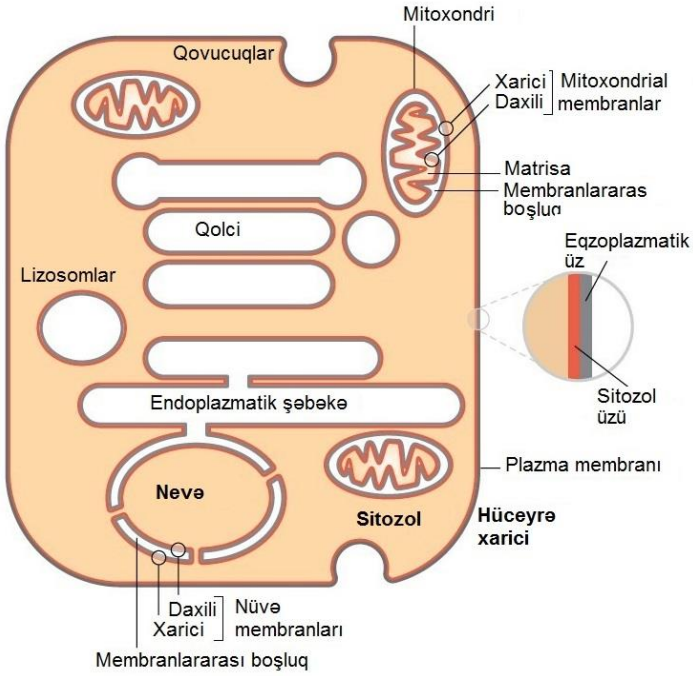
Plazma membranın sitoplazmatik səthi sitozola baxır. Buna oxşar olaraq bir membranla əhatə olunmuş orqanoidlərdə və qovucuqlarda sitozol üz sitozola baxır. Eqzoplazmatik üz həmişə sitozoldan kənara istiqamətlənir və bu halda o orqanoid daxilinədir, daxili sulu mühitlə, və ya lümenlə kontaktdadır.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 7-4 Təmiz fosfolipid ikiqatlısının yaradılması və öyrənilməsi. (*Yuxarıda*) Bioloji membran preparatı, fosfolipidləri və xolesterini selektiv şəkildə həll edən xloroform və metanol (3:1) qatışığı kimi üzvi həlledicilərlə işlənilmişdir. Zülallar və karbohidratlar həll olmayan hissədə qalır. Həlledici buxarlandımaqla uzaqlaşdırılır. (*Aşağıda solda*) Əgər lipidlər, mexaniki olaraq suda dispersiya olunarsa, onlar spontan şəkildə, çarpaz kəsiklərdə göstərilmiş daxilində su mühitli kompartmenti olan liposomları əmələ gətirirlər. (*Aşağıda sağda*) Çarpaz kəsiklərdə göstərilmiş yastı ikiqatlı iki sü mühitini bir-birindən ayıran arakəsmədə kiçik bir deşik üzərində yaranır, belə bir sistem ikiqatlının fiziki xassələrini, məsələn onların məhlulları keçirmək qabliyyətini öyrənmək üçün istifadə oluna bilər.

Qovucuqların lumenləri topoloji olaraq hüceyrəxarici fazaya ekvivalentdir, bu konsepsiya plazma membranının invaqinasiyası (endositozu) yolu ilə yaranan qovucuqların nümunəsində daha asan başa düşülür. Plazma membranın xarici üzü qovucuq membranın daxili üzünə çevrildiyi halda, qovucuqda plazma membranın sitoplazmatik üzü yenə də sitozola baxmış olur (Şəkil 7-6).

Üç orqanoid, nüvə, mitoxondri və xloroplast, bir deyil, iki membranla əhatə olunmuşlar. Hər bir membranın eqzoplazmatik üzü iki membran arasındakı boşluğa baxır. Yəqin ki, bu, Fəsil 12-də müzakirə olunan *endosimbiont fərziyyəyə* əsasıanaraq daha yaxşı anlaşıla bilər, göstərilir ki, mitoxondri və xloroplastlar eukariot hüceyrələrin təkmülünün erkən dövründə, müvafiq olaraq oksidativ forofosforlaşmaya və fotosintezə qabil olan bakteriyların mənimsənilməsi (engulfment) yolu ilə yaranmışdır (bax Şəkil 12-7).



ŞƏKİL 7-5 Hüceyrə membranlarının üzləri. Tək ikiqatlıdan ibarət olan plazma membranı hüceyrəni əhatə edir. Belə yüksək sxematik təsvir olunmada daxili sitozol (qaralmış) və xarici mühit (ağ) ikiqatlının sitozol (qırmızı) və eqzoplazmatik (boz) üzlərini göstərir. Qovucuqlar və bəzi orqanoidlər tək membrana malikdirlər və onların daxili su mühitli (ağ) topoloji olaraq hüceyrənin xaricinə ekvivalentdir. Üç orqanoid – nüvə, mitoxondri və xloroplast (göstərilmir) kiçik membranlararası boşluq ilə ayrılmış iki membranla əhatə olunmuşlar. Bu orqanoidlər ətrafındakı daxili və xarici membranların eqzoplazmatik üzləri onlar arasındakı membranlararası fəza ilə həmsərhəddirlər. Sadəlik üçün, hidrofob membranın daxili bu diaqramda göstərilməmişdir.

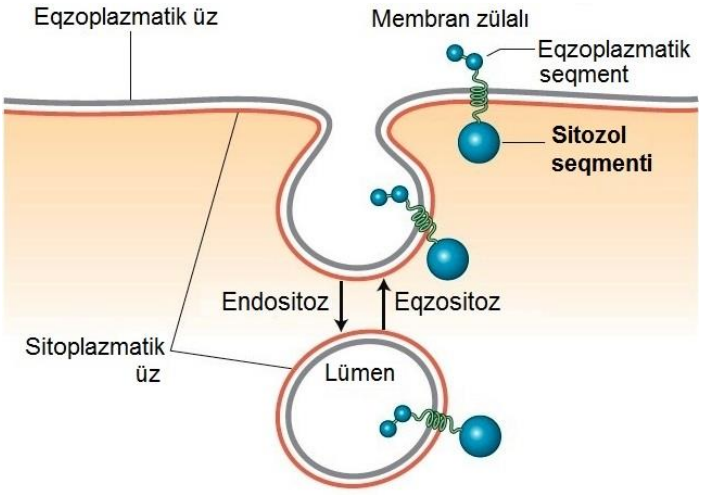
Müxtəlif hüceyrə tiplərindən olan təbii membranlar müxtəlif formaları nümayiş etdirirlər, bu da hüceyrənin fəaliyyətini tamamlayır. Eritrosit plazma membranının hamar, dəyişkən səthi hüceyrəyə imkan verir ki, dar qan kapillyarlarından sürüşərək keçsinlər (Şəkil 7-7a). Bəzi hüceyrələr plazma membranın **kirpicik** və ya **qamçı** adlanan uzun, nazik çıxıntısına malik olurlar, bunlar qamçı şəkilində vururlar (Şəkil 7-7b). Bu hərəkət mayenin hüceyrə təbəqəsinin səthi ilə axmasına səbəb olur və ya sperma hüceyrələrinin yumurta hüceyrələrinə doğru üzməsini təmin edir. Biomembranların formalarının və xassələrinin fərqlənməsi hüceyrə biologiyasının əsas sualını meydana çıxarır, yəni müxtəlif membran quruluşlarının və membranla-ayrılmış

kompartmentlərin identikliyinin yaradılmasında və saxlanılmasında bioloji membranların tərkibi necə tənzimlənilir. Biz bu suala 7.3 bölməsində və Fəsil 14-də qayıdacağıq.

Biomembranlar Üç Əsas Lipid Sinifinə Malikdirlər

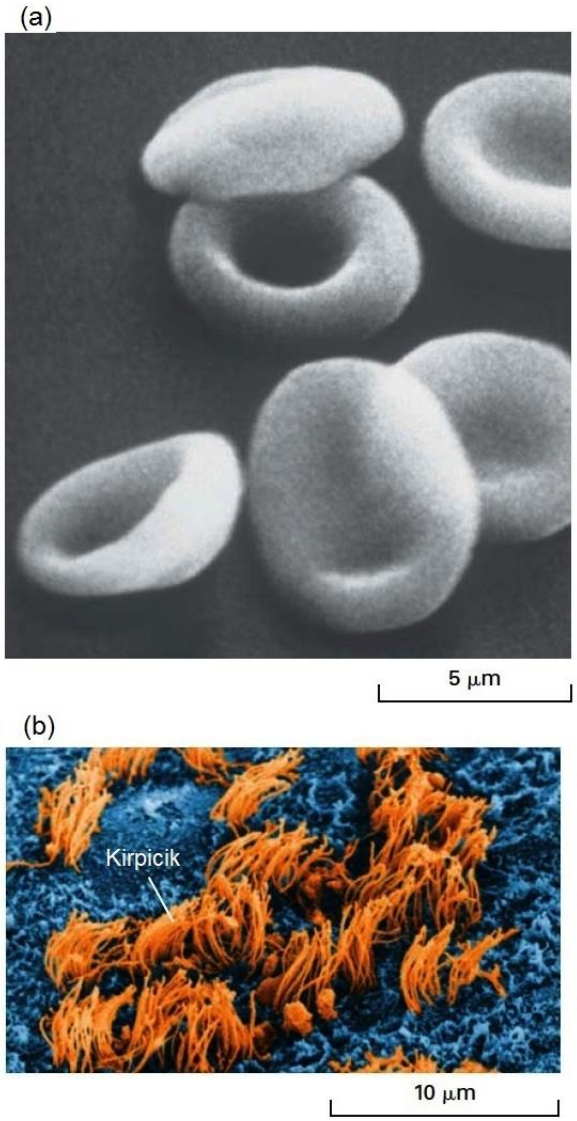
Fosfolipid sözü müəyyən mənada ümumi termindir. O fosfat-əsaslı baş qrupa və iki zəncirdən ibarət olan hidrofob quyruğa malik olan istənilən amfipatik lipidə aid edilir. Tipik biomembran adətən üç sinif amfipatik lipidlərə malik olur: fosfoqliseridlər, sfinqolipidlər, və steroidlər, bunlar kimyəvi quruluşlarına, yayılma zənginliyinə, və membrandakı fəaliyyətinə görə fərqlənirlər (Şəkil 7-8). Bütün fosfoqliseridlər fosfolipidlərə aid olduğu haıda, yalnız müəyyən sfinqolipidlər fosfolipidlərə aiddir amma, sterollar aid deyillər.

Fosfoqliseridlər əksər membranlarda fosfolipidlərin ən geniş yayılmış sinifidir, qliserol-3-fosfatın törəmələridir (bax Şəkil 7-8a). Tipik fosfoqliserid molekulu, efir əlaqəsi ilə qliserin molekulunun hidroksil qrupuna birləşmiş iki yağ-turşusu-əsaslı (asil) zəncirlərdən ibarət olan hidrofob quyruqdan və fosfat qrupuna birləşmiş polyar baş qrupdan təşkil olunmuşdur. İki yağ asil zəncirləri onların təşkil olunduqları karbonların sayına görə (ən çox yayılan 16 və ya 18) və doyma dərəcəsinə (0, 1 və ya 2 ikiqat rabitə) görə fərqlənə bilirlər.



ŞƏKİL 7-6 Membran tumurcuqlaması və qovuşması zamanı hüceyrə membranlarının üzləri saxlanılır. Qırmızı membran səthləri sitozol üzüdür; boz səthlər isə eqzoplazmatik üzüdür. Endositoz zamanı plazma membranın bir hissəsi içəriyə sitozola doğru tumurcuqlayır və tədricən bir qovucuq kimi ondan qopub ayrılır. Bu prosesin gedişi zamanı plazma membranın sitozol üzü sitozola baxan vəziyyətdə qalır, yeni yaranmış qovucuq membranının eqzoplazma üzü qovucuğun lümeninə baxır. Eqzositoz zamanı hüceyrədaxili qovucuqlar plazma membranla qovuşur və qovucuğun lümeni (eqzoplazma üzü) hüceyrəxarici mühitlə birləşir. Membrana sarınmış zülallar, qovucuqların tumurcuqlaması və qovuşması zamanı öz asimmetrik orientasiyasını saxlayırlar, xüsusilə onun eyni seqment həmişə sitozola baxmış olur.

Fosfoqliseridlər onlardakı baş qrupun təbiətinə görə təsnifləşdirilirlər. Plazma membranda ən geniş yayılmış fosfolipidlər olan fosfatidilxolinlərdə baş qrup xolindən təşkil olunmuşdur, müsbət yüklənmiş spirt mənfi yükləniş fosfatla efir əmələ gətirmişdir. Başqa fosfoqliseridlərdə, etanolamin, serin və ya şəkər törəməsi olan inozitol kimi OH– qrupuna malik olan molekullar fosfat qrupu ilə bağlı olur. Mənfi yüklənmiş fosfat qrupu və müsbət yüklənmiş qruplar və ya baş qrupdakı hidroksil qrupları su ilə güclü əlaqəyə girir. Neytral pH-da bəzi fosfoqliseridlər (məsələn, fosfatidilxolin və fosfatidiletanolamin) elektrik yükü daşımırlar, halbuki başqaları (məsələn, fosfatidilinozitol və fosfatidilserin) bir mənfi yükü daşıyırlar.



ŞƏKİL 7-7 Müxtəlif hüceyrə tiplərində membranların variasiyası. (a) Skanedici elektron mikrofotosundan göründüyü kimi, hamar dəyişkən membran diskşəkilli eritrosit hüceyrələrinin səthini örtür. (b) Kirpiciklər dəsti beyin mədəciklərini örtən epidermal hüceyrələrdən qabarıb çıxır. [(a) hissəsi müəlliflik hüququ Omikron/Science Source-dan. (b) hissəsi ipofoto Associate/Science Source-dan.]

Bununla belə, bütün bu fosfolipidlərdə olan polyar baş qruplar xarakterik ikiqat quruluşda bir yerə bükülə bilirlər. Fosfolipidlər fosfoqliseridlər kimi fəaliyyət göstərəndə onlar, iki asil zəncirlərindən biri olmayan lizofosfolipidləri əmələ gətirirlər. Lizofosfolipidlər, hüceyrələrdən buraxılmış və spesifik reseptorlar tərəfindən tanınan əhəmiyyətli siqnal molekulları olmaqla bərabər, onların mövcud olması onların yerləşdiyi membranların fizioloji xassələrinə də təsir edir.

Plazmalogenlər qliseridlər qrupu olub, qliserindəki 2-ci karbona mürəkkəb efir əlaqəsi ilə birləşmiş bir yağ asil zəncirinə malikdir və bir uzun karbohidrogen zəncir qliserinin 1-ci karbonuna mürəkkəb efir əlaqəsi ilə deyil sadə efir əlaqəsi ilə (C—O—C) birləşir. Plazmalogenlər xüsusən insanın beynində və ürək toxumasında zəngindir. Plazmalogenlərdə sadə efir əlaqəsinin mürəkkəb efir əlaqəsi ilə müqayisədə böyük kimyəvi stabilliyə malik olması, və plazmogenlərlə başqa fosfoqliseridlər arasında üç-ölçülü quruluşda olan incə fərqlər yəqin ki, hələ də tam anlaşılmayan fizioloji əhəmiyyət kəsb edir.

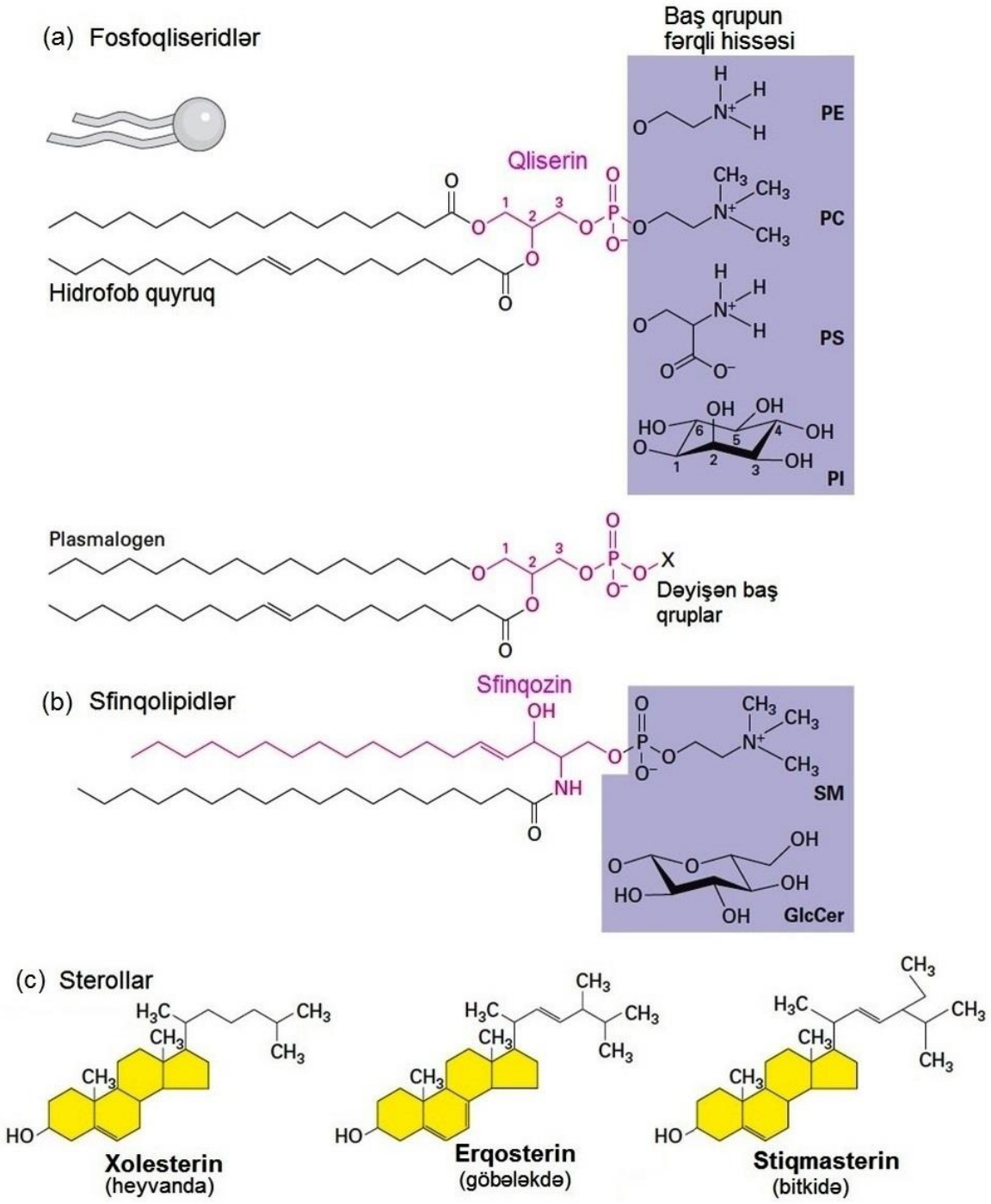
Membran lipidlərinin ikinci sinifi **sfinqolipidlərd**ir. Bütün bu birləşmələr, uzun karbohidrogen zəncirinə malik olan amino spirt sfinqozindən törəmişlər və amid əlaqəsi ilə sfinqozin amin qrupuna birləşmiş uzun zəncirli yağ turşusuna malikdirlər (bax Şəkil 7-8b). Fosfoqliseridlər kimi, bəzi sfinqolipidlər fosfat-əsaslı polyar baş qrupa malikdirlər. Sfinqomyelində ən zəngini sfinqolipid olan fosfoxolin sfinqozinin terminal hidroksil qrupuna birləşmişdir (bax Şəkil 7-8b, SM). Beləliklə sfinqomyelin fosfolipiddir və onun ümumi quruluşu fosfatidilxolinin ümumi quruluşuna kifayət qədər oxşardır. Sfinqomyelinlər formalarına görə fosfoqliseridlərə oxşardır və onlarla birlikdə qatışıq ikiqatlını əmələ gətirə bilirlər. Başqa sfinqolipidlər *amfipatik qlikolipidlərdir*, onların polyar baş qrupları şəkərlərdir və fosfat qrupu vasitəsi ilə quyruqla birləşmirlər (beləliklə, onlar texniki olaraq fosfolipid deyillər). Ən sadə qlikosfinqolipid olan *qlükozilserebrozid* sfinqozinə birləşmiş bir qlükoza vahidinə malikdir. *Qanqliozid* adlanan mürəkkəb qlikosfinqolipidlərdə, siall turşusu qruplarına malik olan bir və ya iki şaxələnmiş şəkər zəncirləri (oliqosaxaridlər) sfinqozinə birləşmişdir. Qlikolipidlər plazma membranda olan ümumi lipidlərin 2-10 faizini təşkil edir; onlar əsasən sinir toxumalarında zəngindirlər.

Xolesterin və onun analoqları membran lipidlərinin üçüncü əhəmiyyətli sinifini **sterollar**ı təşkil edirlər. Sterolların əsas quruluşu dörd-həlqəli izoprenoid karbohidrogendir. Əsas maya sterolunun (erqosterol) və bitki fitosterollarının (məsələn, stiqmasterol) quruluşları heyvanların əsas sterolu olan xolesterinin quruluşundan yüngülcə fərqlənirlər (bax Şəkil 7-8c). Göbələk və heyvan sterollarının biosintez yollarındakı və quruluşlarındakı kiçik fərqlər müasir dövrdə istifadə olunan göbələyə qarşı (antifungal) dərmanların çoxunun əsasını təşkil edir. Digər iki sterolda olduğu kimi, xolesterin həlqələrinin birində hidrogen hidroksil qrupu əvəz olunur. Baxmayaraq ki, xolesterin demək lar ki, tərkibinə görə bütövlükdə karbohidrogendir, o amfipatikdir, çünki onun karboksil qrupu su ilə əlaqə yarad bilir. Onun fosfat-əsaslı baş qrupu olmadığından o fosfolipid deyildir. Xolesterin xüsusən də məməlilərin hüceyrələrinin plazma membranda zəngindir, amma prokariot hüceyrələrin əksəriyyətinin və bitki hüceyrələrinin plazma membranında olmurlar. Bitki plazma membranının lipid tərkibinin 30-50 faizə qədəri böyük bir hissəsi bitkilər üçün unikal olan müəyyən steroidlərə aiddir. Məməlilərin əksər hüceyrələrində xolesterinin 50 faizdəın 90 faizə qədər hissəsi plazma membranında və onlarla bağlı olan qovucuqlardadır. Xolesterin və başqa sterollar, öz ikiqatlı quruluşlarını sərbəst əmələ gətirə bilmək üçün çox hidrofobdurlar. Əvəzində onlar, təbii biomembranlarda tapılmış qatılqda bu steroidlər biomembranlara daxil olmaq üçün fosfolipid molekulları arasında interkalasiya olunmalıdırlar (yerlıəşməlidirlər). Belə interkalasiya olunma zaamanı, sterollar membranların quruluşunun saxlanılmasını təmin edir, membran mayeliyinin əhəmiyyətli ölçülərini saxlamaq üçün onlarda fosfolipidlərin asil zəncirlərinin sıx şəkildə bükülməsinə mane olur və eyni zamanda mexaniki dəstək kimi tələb olunan lazımlı möhkəmliyi verirlər. Bu təsirlərdən bəziləri, aşağıda müzakirə oluan lipid "raft"larda olduğu kimi yüksək dərəcədə lokal ola bilər.

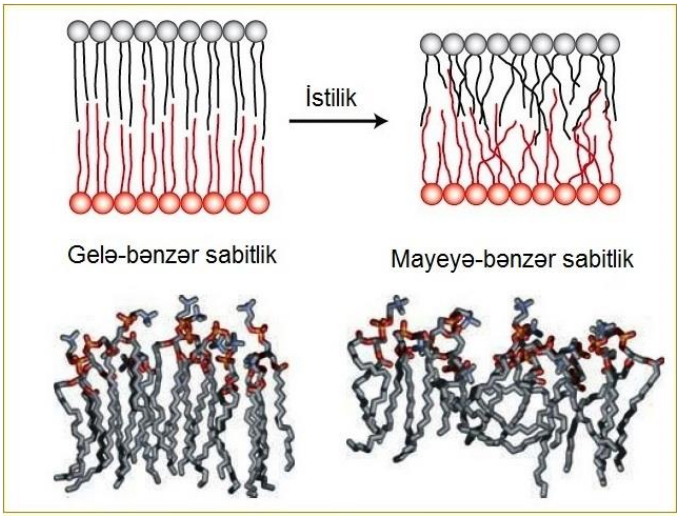
Membranlardakı quruluş rolundan başqa, xolesterin həm də bir sıra əhəmiyyətli bioloji fəal molekulların sələfləridir. Bunlara, qaraciyərdə əmələ gələn və qida piylərinin həzm olunması və bağırsaqlarda sorulması üçün emulsiya olunmasına kmək edən *öd turşuları* aiddir, endokrin hüceyrələr tərəfidən istehsal olunan steroid hormonlar (məsələn, adrenal vəz, yumurtalıq, yumurtacıqlar), həmçinin dəridə və böyrəklərdə sintez olunan D vitamini aiddirlər. Xolesterinin başqa kritik əhəmiyyətli fəaliyyəti onların, embrional inkişafın əsas siqnal molekulu olan hechoq (kirpi) zülallara (bax Fəsil 16) kovalent birləşməsidir.

Lipidlərin Əksəriyyəti və Çox Zülallar Biomembranlarda Lateral Hərəkətdədirlər

Lipid ikiqatlısının iki-ölçülü müstəvidə termal hərəkət lipid molekullarının öz uzun oxları ətrafında sərbəst fırlanmasına və hər bir membran vərəqsi daxilində lateral (yana) diffuziya etməsinə imkan verir. Belə hərəkətlər lateral və ya fırlanan olduğundan, yağ asil zəncirləri ikiqatlının hidrofob daxilində qalır. Həm təbii həm də süni membranlarda tipik lipid mlekulları vərəqədə öz qonşuları ilə yerlərini bir saniyədə 10^7 dəfə dəyişirlər və 37ºC-də hər saniyədə bir neçə mikrometr diffuziya edirlər. Bu diffuziya sürəti göstərir ki, suya nisbətən lipid ikiqatlısı 100 dəfə artıq özlülüyə malikdir, təxminən zeytun yağının özlülüyü kimi. Baxmayaraq ki, lipidlər ikiqatlıda su məhlullarına nisbətən daha yavaş diffuziya edirlər, membran lipidi tipik bakteriya hüceyrəsi uzunluğunu (1 μm) cəmi bir saniyəyə diffuziya edir, heyvan hüceyrəsi uzunluğunu isə təxminən 20 saniyəyə diffuziya edir. Süni təmiz fosfolipid membranlar 37ºC-dən aşağı temperatura soyudulduqda lipidlər, maye su donarkən maye-bərk keçidinə oxşar olaraq, mayeyə-bənzər (maye) vəziyyətdən gelə-bənzər (yarım-bərk) vəziyyətə (Şəkil 7-9) *faza keçidinə* uğrayırlar, Faza-keçidindən aşağı temperaturunda, lipidlərin diffuziya sürəti kəskin şəkildə aşağı düşür. Adi fizioloji temperaturlarda, təbii membranların hidrofob daxili, aşağı temperaturlarda müşahidə olunan gelə-bənzər sabitliyin əksinə olaraq əsasən aşağı özlülüyə və mayeyə-bənzər sabitliyə malik olur.



ŞƏKİL 7-8 Membran lipidlərinin üç sinifi. (a) Fosfoqliseridlərin əksəriyyəti qliserol-3-fosfatın törəmələridirlər (qırmızı), bunlar iki əhəmiyyətli yağ asil zəncirinə malik olub hidrofob "quyruğu" təşkil edir və polyar "baş qrupda" fosfatla efir əmələ gətirirlər. Yağ turşuları uzunluqlarına görə fərqlənirlər və doymuş (ikiqat rabitəsiz) və ya doymamış (bir, iki və ya üç ikiqat rabitə) olurlar. Fosfatidilxolində (PC) baş qrup xolindir. Həmçinin göstərilənlər, digər üç çox yayılmış fosfolipidlərdəki—fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilserin (PS), və fosfatidilinozitoldakı (PI) fosfat qrupuna qoşulmuş molekullardır. Plazmalogenlər qliserinə bir efir əlaqəsi ilə birləşmiş və bir mürəkkəb efir əlaqəsi ilə birləşmiş yağ asil zəncirinə malikdir, bunlar da başqa fosfoqliseridlərdəkinə oxşar baş qrupa malikdirlər. (b) Sfinqolipidlər uzun karbohidrogen zəncirinə malik olan aminospirt sfinqozinin (qırmızı) trəmələridir. Müxtəlif yağ asil zəncirləri amid əlaqəsi ilə sfinqozinə bağlanır. Fosfoxolin baş qrupuna malik olan sfinqomiyelinlər (SM) fosfolipidlərdir. Başqa sfinqolipidlər qliseroidlərdir, bunlarda tək bir şəkər qalığı və ya şaxələnmiş oliqosaxarid sfinqozin özülə birləşir. Məsələn, sadə qlikolipid qlikozilserebrozid (GicCer) qlükoza baş qrupuna malikdir. (c) Əsas sterollar heyvanlarda (xolesterol), göbələklərdə (erqosterol) və bitkilərdə (stiqmasterol) quruluşlarına görə yüngülcə fərqlənirlər, amma hamısı hüvceyrə membranlarının əsas komponenti rolunu oynayırlar. Sterolların əsas quruluşu dörd həlqəli karbohidrogendir (sarı). Başqa membran lipidləri kimi, sterollar da amfopatikdirlər. Vahid bir hidroksil qrupu başqa lipidlərdəki polyar baş qrupa ekvivalentdir, konyuqasiya olunmuş halqa və qısa karbohidrogen zəncir hidrofob quyruğu əmələ gətirirlər. Bax H. Sprong et al., 2001, *Nature Rev. Cell Biol*.**2**:504.



ŞƏKİL 7-9 Fosfolipid ikiqatlının gel və maye formaları. (*Yuxarıda*) Geldən-mayeyə keçidin təsviri. Uzun doymuş yağ asil zəncirlərinə malik olan fosfolipidlər yüksək dərəcədə nizamlı gelə-bənzər ikiqatlının yığılmasına meyillidir, və iki vərəqədə qeyri-polyar quyruqlar çox az üst-üstə düşür. İstilik qeyri-polyar quyruqların nizamını pozur və yalnız bir neçə dərəcə kiçik temperatur civarında gel formasından maye formasına keçidi induksiya edir. Zəncirlərin nizamı pozulduğundan ikiqatlının qalınlığı da azalır. (*Aşağıda*) Molekulyar dinamikanın hesablanmasına görə fosfolipid birqatlının gel və maye vəziyyətində molekulyar modeli. [Verilənlər H.Heller et al., 1993, *J.Phys.Chem*. **97**:8343.]

Təmiz membran ikiqatlısında (məsələn, zülallar olmayanda) fosfolipidlər və sfinqolipidlər fırlanır və yana (lateral) hərəkət edirlər, amma spontan şəkildə miqrasiya etmirlər və ya bir vərəqdən digərinə tez-tez (flip-flop) keçmirlər. Energetik baryer çox yuxarıdır, miqrasiya, polyar baş qrupun ikiqatlının karbohidrogen özəyindən keçərək öz sulu mühitindən dəgər tərəfdəki sulu məhlula hərəkət etməsini tələb edərdi. Fəsil 11-də müzakirə olunan xüsusi membran zülalları, membran lipidlərinin və digər polyar molekulların bir vərəqdən digərinə atılması üçün tələb olunur.

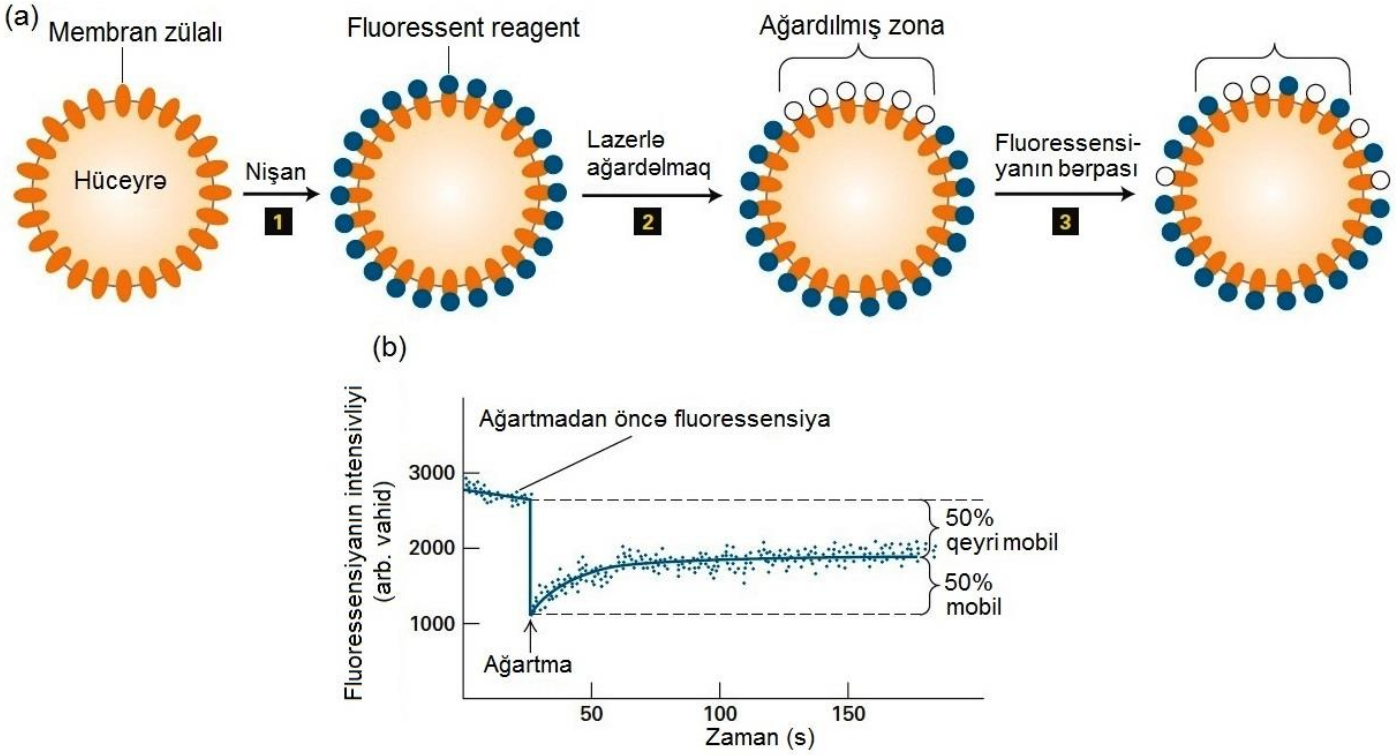
Spesifik plazma membranı zülallarının və lipidlərin yana hərəkəti *fotoağardılmadan sonra fluoressensiya bərpası* (*fluorescence recovery after photobleaching* - ***FRAP***) adlanan metodla kəmiyyətcə ölçülə bilər. Lipid hərəkətinin monitorinqi üçün fluoressent əvəzləyicilərə malik olan fosfolipidlər istifadə edilir. Zülallar üçün, istədiyimiz zülalın eqzoplazmatik domeninə spesifik olan və yalnız bir antigen birləşmə saytına malik olan monoklonal anticismin fraqmenti fluoressent boya ilə yarlıklanır. Şəkil 7-10-da təsvir olunan bu metodla membran molekullarının hərəkət etmə sürəti—diffuziya əmsalı—təyin edilə bilir, eləcə də lateral hərəkətdə olan molekulların nisbəti təyin edilə bilər.

Fluoressent nişanlanmış fosfolipidlərlə FRAP tədqiqatların nəticələri göstərdi ki, fibroblast plazma membranlarında bütün fosfolipidlər 0.5 μm məsafədə sərbəst hərəkət edirlər, amma çox uzaq məsafəyə diffuziya edə bilmirlər. Bu kəşflər göstərdi ki, plazma membranın təxminən 1 μm diametrdə olan zülala-zəngin rayonları, kütləvi membran fosfolipidlərinə malik olan lipidlə zəngin rayonları ayırır. Fosfolipidlər belə rayonlar daxilində sərbəst diffuziya edə bilirlər, amm lipidlə zəngin olan bir rayondan yaxındakı digər rayona edə bilmirlər. Bundan başqa, plazma membranında lipidlərin yana diffuziya sürəti təmiz fosfolipid ikiqatlılara nisbətən dəfələrlə yavaşdır: diffuziya sabiti plazma membranı və lipid ikiqatlısı üçün uyğun olaraq 10^{-8} cm^2/s və 10^{-7} cm^2/s xarakterikdir. Bu fərq göstərir ki, bəzi membranlarda lipidlər ola bilsin ki, sıx amma geriyə dönməyən şəkildə müəyyən inteqral zülallara birləşmişdir, bu həqiqətən də son zamanlar nümayiş etdirilmişdir (aşağıda halqalı fosfolipidlərin müzakirəsinə bax).

Lipid Tərkibi Membranların Fiziki Xassəsinə Təsir Edir

Tipik hüceyrədə çoxsaylı müxtəlif tipli membranla olur, onların hər biri ona məxsus olan xüsusi zülal və lipid tərkiblərindən yaranan unikal xassələrə malik olur. Cədvəl 7-1-də göstərilmiş verilənlər müxtəlif membranlarda lipid tərkibinin variasiyasını göstərir. Məsələn, fosfoqliseridlərin və sfinqolipidlərin nisbi zənginliyi fosfolipidlərin sintez olunduğu endoplazmatik şəbəkənin (ER) membranlarında və sfinqolipidlərin sintez olunduğu Qolci aparatı membranlarında fərqlənir. Ümumi membran lipid fosforunda sfinqomyelinin faizlə nisbəti Qolci membranlarında ER membranlarına nisbətən 6 dəfə yuxarıdır. Başqa hallarda, membranların bir hüceyrə kompartmentindən digərinə hərəkəti bəzi membranları selektiv şəkildə xolesterin kimi lipidlərlə zənginləşdirir. Orqanizm daxilində müxtəlif mühitlərə cavab verərkən müxtəlif növ hüceyrələr fərqli lipid tərkibə malik olan membranları yaradırlar. Məsələn, bağırsaq yolunda örtən hüceyrələrdə, qida maddələrinin həzm olunduğu çox sərt ətraf mühitə baxan hüceyrələrdə sfinqolipid-fosfoqliserid-xolesterin nisbəti normal şəraitdə olan hüceyrələrdəki 0.5:1.5:1 nisbəti əvəzinə 1:1:1 nisbətinə malikdir. Bu bağırsaq membranlarında sfinqolipidlərin qatılığının müqayisəli dərəcədə yüksək olması ola bilsin ki, sfinqozin hissəsindəki sərbəst ─OH qrupları hesabına hidrogen əlaqələrinin çoxluğuna əsasən onun stabilliyini artırır (bax Şəkil 7-8).

İkiqatlının mayelilik dərəcəsi lipidin tərkibindən, fosfolipidim hidrofob quyruğunun quruluşundan və temperaturdan asılıdır. Artıq qeyd olunduğu kimi, van-der-Vaals qarşılıqlı əlaqələr və hidrofob təsir fosfolipidlərin qeyri polyar quyruqlarının aqreqasiyasına səbəb olur. Uzun doymuş yağ asil zəncirləri aqreqasiya etməyə, gelə-bənzər vəziyyətdə sıx şəkildə bir yerdə bükülməyə güclü meyillidirlər. Qısa yağ asil zəncirlərinə malik olan fosfolipidlər, hansı ki, çox az səthə malikdirlər və daha az van-der-Vaals qarşılıqlı əlaqələrinə malikdirlər, daha çox maye ikiqatlısını əmələ gətirirlər. Eləcə də, *cis*-doymamış yağ asil zəncirlərinində əyilmələr (ilgəklər) (Fəsil 2) onların başqa yağ turşuları ilə az stabilliyə malik olan van-der-Vaals qarşılıqlı təsirinin yaranmasına səbəb olur, beləliklə, daha sıx şəkildə bir yerə bükülən düz quruluşa malik olan zəncirlərlə müqayisədə daha çox mayeliliyə malik ikiqatlını yaradırlar.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 7-10 Fotoağartmadan sonra fluoressensiyanın bərpası (FRAP) eksperimentləri plazma membran daxilində zülalların və lipidlərin lateral hərəkətini miqdari analiz edə bilər. (a) Eksperimentin gedişi. Pillə 1: Hüceyrələr əvvəlcə spesifik membran lipidlərinə və ya zülallarına bərabər şəkildə birləşən fluoressent reagentlə nişanlanır. Pillə 2: Sonra lazer işıq səthdə kiçik sahəyə yönəldilir, birləşmiş reagent geriyə-dönməyən ağardılır və beləliklə, işıqlandırılan bu sahədə fluoressensiya reduksiya olunur. Pillə 3: Müəyyən vaxtda, ağardılmamış fluoressent səth molekulları şüalandırılmış sahə daxilinə diffuziya etdikcə və ağardılmış molekullar oradan kənara diffuziya etdikcə ağardılan bu parçanın fluoressensiyası artır. Ağardılmış hissədə fluoressensiyanın bərpa dərəcəsi mebranda hərəkətdə olan nişanlanmış molekulların fraksiyasına mütənasibdir. (b) İnsanın, asialoqlikozülal reseptor zülalaına spesifik olan fluoressent anticismlə işlənilmiş hepatoma hüceyrələri ilə FRAP eksperimentin nəticələri. Fluoressensiyanın 50 faizinin ağardılmış sahəyə qayıtmasının aşkar edilməsi göstərir ki, şüalandırılmış membran hissəsində reseptor molekullarının 50 faizi hərəkətdədir (mobildir) və 50 faizi hərəkətsizdir. Fluoressensiyanın bərpa olunma dərəcəsi nişanlanmış molekulların ağardılmış rayona miqrasiya dərəcəsi ilə mütənasib olduğundan membranda zülal və ya lipidin diffuziya əmsalı bu cürə nəticələrdən hesablana bilər. Bax Y.I. Henis et al., 1990, *J.Cell Biol*. **111**:1409.

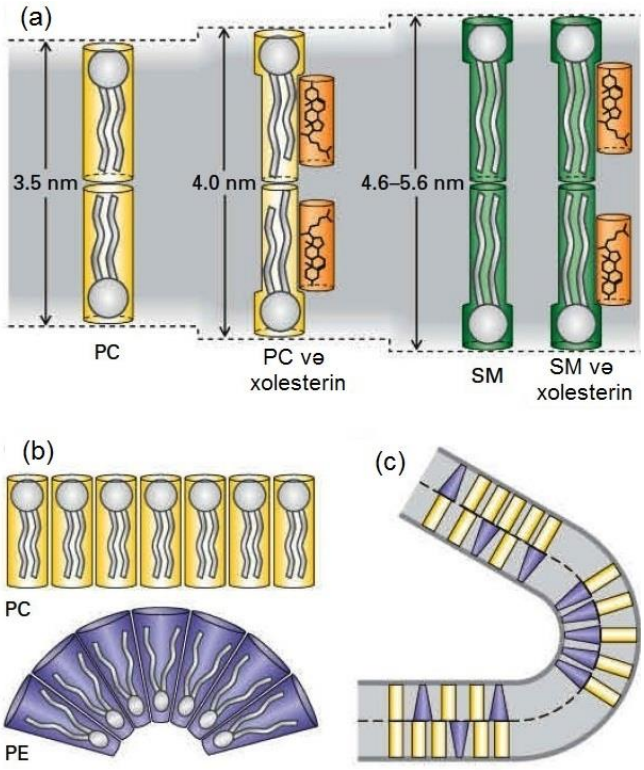
Xolesterin, təbii membranların, hüceyrənin normal inkişafı və artması üçün tələb olunan müvafiq mayeliliyinin saxlnılması üçün əhəmiyyətlidir. Xolesterin fosfolipid baş qrupların membran vərəqlərinin xarici səthində təsadüfi hərəkətlərini məhdudlaşdırır, amma onun uzun fosfolipid quyruqlarının hərəkətinə təsiri onun qatılığından asılıdır. Normal halda plazma membranında xolesterinin rast gəlinən qatılığında, steroid halqaların fosfolipidlərin uzun hidrofob quyruqları ilə qarşılıqlı təsiri bu lipidləri hərəkətsiz (immobilizasiya) olmağa meyilli edir və beləliklə membranın maeliliyini azaldır. Unikal lipid və zülal tərkiblərinin diskret subdomenləri daxilində plazma membranının təşkil olnmasına kömək edən məhz bu xassədir. Amma, aşağı xolesterin qatılığında, steroid həlqə fosfolipid quyruqları ayırır və dağıdır (səpir), membranın daxili rayonlarının mayeliliyinin azaca artmasına səbəb olur.

İkiqatlının lipid tərkibi onun qalınlığına da təsir edir, o isə öz növbəsində başqa membran komponentlərinin, məsələn zülalların xüsusi menbranda bir paylanmasına təsir edir. Belə iddia edilirdi ki, müəyyən Qolcidə-məskunlaşan fermentlərin (qlikoziltransferazalar) nisbətən qısa transmembran seqmentləri onların Qolci membranının lipid tərkibinə uyğunlaşmasıdır və bu, fermentlərin Qolci menbranlarında tutulub saxlanılmasına kömək edir. Süni membranlar üzərində aparılan biofiziki tədqiqatlar göstərdilər ki, fosfoqliseridlərə nisbətən sfinqomiyelin daha çox gelə-bənzər və daha qalın ikiqatlı formaya assosasiya edir (Şəkil 7-11a). Xolesterin və membranın mayeliliyini azaldan digər molekullar da həmçinin membranın qalınlığını artırır. Sfinqomyelin quyruqlar optimal sabitləşdiyindən, xolesterinin əlavə olunması sfinqomyelin ikiqatlısının qalınlığına təsir etmir.

CƏDVƏL 7-1 Seçilmiş membranların əsas lipid komonentləri.

Tərkibi (mol %)				
Mənbəyi/Yerləşməsi	**PC**	**PE + PS**	**SM**	**Xolesterin**
Plazma membranı (insan eritrositləri)	21	29	21	26
Myelin membranı (insan neyronu)	16	37	13	34
Plazma membranı (maş paxlası)	47	43	0	0
Daxili mitoxondrial membran (gül kələm)	42	38	0	0
Xarici mitoxondrial membran (gül kələm)	47	27	0	0
Plazma membranı (*E. Coli*)	0	85	0	0
Endoplazmatik şəbəkə membranı (siçovul)	60	25	3	7
Qolci membranı (siçovul)	51	26	8	13
Daxili mitoxondrial membran (siçovul)	40	37	2	7
Xarici mitoxondrial membran (siçovul)	54	31	2	11
Əsas vəzəqələrin yerləşməsi	Eqzoplazmatik	Sitozol	Eqzoplazmatik	Hər iki

PC = fosfatidilxolin; PE = fosfatidiletanolamin; PS = fosfatidilserin; SM = sfinqomyelin;
Mənbə: S. E. Horvath and G. Daum, 2013, Lipids of mitochondria, *Progress in Lipid Research* **52**:590–614.



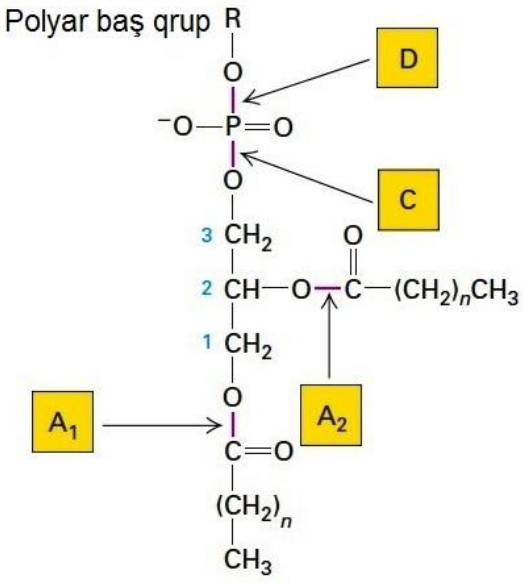
ŞƏKİL 7-11 Lipid tərkibinin ikiqatlının qalınlığına və əyilmələrinə təsiri. (a) Təmiz sfinqomyelin (SM) ikiqatlısı fosfatidilxolin (PC) kimi fosfoqliseridlərin əmələ gətirdiyi ikiqatlıdan qalındır. Xolesterin fosfoqliserid ikiqatlısı üzərində lipidlə-nizamlanan təsirə malikdir və onların qalınlığını artırır, amma o daha çox nizamlı olan SM ikiqatlısının qalınlığına təsir etmir. (b) PC kimi fosfolipidlər silindirik formaya malikdirlər və əsasən düz (yastı) birqatlıları əmələ gətirir, halbuki kiçik baş qrupa malik olanlar, məsələn fosfatidiletanolamin (PE) konusvari formaya malikdir. (c) Eqzoplazmatik vəzəqədə PC ilə, siozol vəzəqədə isə PE ilə zəngin olan ikiqatlı, çox plazma membranlarında olduu kimi, təbii əyriliyə malik olmalıdır. Bax H. Sprong et al., 2001, *Nature Rev.Mol.Cell Biol* **2**:504.

İkiqatlının lipid tərkibindən asılı olan başqa bir xassə onun əyilmələridir, bu da polyar baş qrupun və onu təşkil edən fosfolipidlərin qeyri polyar quyruqlarının nisbi ölçülərindən asılıdır. Uzun quyruğa və böyük baş qrupa malik olan lipidlər formaca silindirikdirlər, kiçik baş qrupa malik olanlar isə konus formasındadırlar (Şəkil 7-11b). Nəticədə, silindirik lipidlərdən təşkil olunmuş ikiqatlı nisbətən yastıdır, halbuki böyük sayda konus formalı lipidlərə malik olanlar əyilmiş (burulmuş) ikiqatlını əmələ gətirirlər (Şəkil 7-11c). İkiqatlının burulmasına lipid tərkibinin belə təsiri, virus tumurcuqlaması saytlarında olduğu kimi (bax Şəkil 7-2) və plazmatik membrandan daxili qovucuqların yarandığı kimi (vax Şəkil 7-6) yüksək dərəcədə burulmuş membranların formalaşmasında və mikrovillər kimi ixtisaslaşmış stabil membran quruluşlarının formalaşmasında rol oynaya bilir. Bir sıra zülallar fosfolipid ikiqatlılarının səthinə birləşir və membranın burulmasına səbəb olur, belə zülallar, donor membrandan tumurcuqlayıb ayrılan daşıyıcı qovucuqların formalaşması üçün əhəmiyyətlidirlər (Fəsil 14).

Eqzoplazmatik və Sitozol Vərəqlədə Lipid Tərkibi Müxtəlifdir

İkiqatlıda lipid tərkibinin asimmetrik olması bütün biomembranlara xarakterikdir. Baxmayaraq ki, fosfolipidlərin əksəriyyəti hər iki membran vərəqlərində mövcud olur, bəziləri adətən bir və ya digər vərəqədə daha zəngin olur. Məsələn, insan eritrositlərinin plazma membranında və kulturada bitən Madin Darbi it böyrəyi (Madin Darby canine kidney – MDCK) hüceyrələrinin plazma membranında demək olar ki, bütün sfinqomyelin və fosfatidilxolin eqzoplazmatik vərəqədə tapılmışdırlar, bunların hər ikisi az mayeliliyə malik olan ikiqatlını əmələ gətirirlər. Əksinə, daha çox maye ikiqatlını əmələ gətirən fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin və fosfatidilinozitol daha böyük üstünlüklə sitozol vərəqədə yerləşirlər. Fosfatidilserin və fosfatidilinozitol xalis mənfi yükü daşıdığından, membranı bir dəfə kəsib keçən membran zülalında sitoplazmatik üzdəki aminturşu ardıcıllığı, transmembran seqmentə çox yaxın olan hissədə çox vaxt müsbət yüklənmiş

(Lys, Arg) qalıqlarla zəngin olur, (yüklənmiş amin turşularının belə paylanması "daxili müsbət" qayda adlanır). Lipidlərin ikiqatlını bu cürə kəsib keçən seqreqasiyası membran burulmalarına təsir edə bilər (bax Şəkil 7-11c). Xüsusi fosfolipidlərdən fərqli olaraq, xolesterin hüceyrə membranlarının hər iki vərəqəsində nisbətən bərabər paylanmışdır.



ŞƏKIL 7-12 Fosfolipazaların spesifikliyi. Hər bir fosfolipaza tipi, qırmızı rəngdə göstərilmiş həssas əlaqələrdən birini kəsir. Qliserinin karbon atomları kiçik nömrələrlə göstərilmişdir. Ətraf mühitdə bütöv hüceyrələrdə, yalnız plazma membranın eqzoplazmatik vərəqələrində olan fosfolipidlər fosfolipazalarla kəsilir. Sitozol fermenti fosfolipaza C, plazma membranın sitozol vərəqəsində müəyyən fosfolipidləri kəsir.

Xüsusi bir fosfolipidin plazma membranının iki vərəqəsindəki nisbi zənginliyi, asil zəncirlərinin və baş qruplarının lipid molekuluna birlıəşdiyi efir əlaqələrini qıran ferment **fosfolipazalarla** fosfolipidlərin hidroliz olunmaq həssaslığına əsaslanan eksperimental yolla təyin edilə bilər (Şəkil 7-12). Xarici mühitə əlavə ediləndə fosfolipazalar membranı kəsib keçə bilmirlər, beləliklə onlar yalnız membranın eqzoplazmatik üzündə yerləşən lipidlərin baş qrupuni kəsib ayırırlar, fermentlər plazma membranın sitozol üzünə keçə bilmədiyindən sitozol vərəqəsində olan fosfolipidlər hidrolizə dözümlü olurlar.

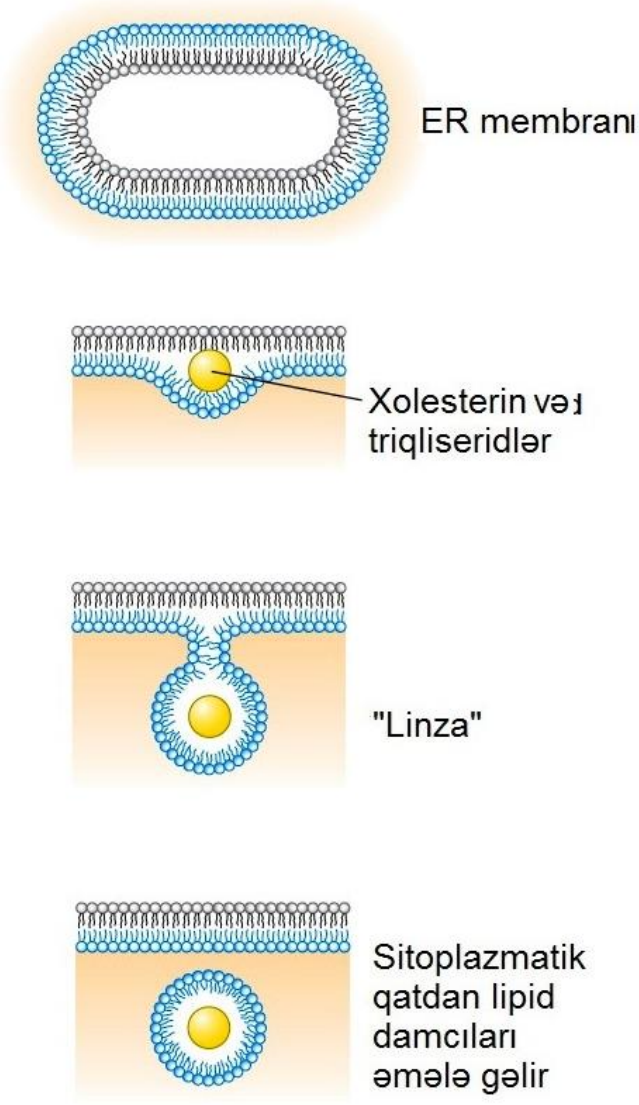
Membran vərəqələrində fosfolipidlərin asimmetrik paylanmasının necə baş verdiyi hələ tam aydın deyil. Təmiz ikiqatlılarda qeyd olunduğu kimi, fosfolipidlər bir vərəqədən digərinə kortəbii (spontan) şəkildə miqrasiya və ya şap-şup (flip-flop) etmir. Fosfolipid paylanmasının asimmetriyasını qismən onların sintez olunduqları endoplazmatik şəbəkə və Qolci əks etdirə bilər. Sfinqomyelin Qolcinin luminal (eqzoplazmatik) üzündə sintez olunur və plazma membranın eqzoplazmatik üzünə çevrilir. Əksinə, fosfoqliseridlər **ER membranin** sitozol üzündə sintez olunurlar və topoloji olaraq plazma membranın sitozol üzünə ekvivalent olurlar (bax Şəkil 7-5). Lakin, aydındır ki, bu izah fosfatidilxolinin (fosfogliseridin) ekzoplazmatik vərəqədə üstünlük təşkil etməsini nəzərə almır. Bu fosfoqliseridin və yəqin ki, başqalarının da bəzi təbii membranlarda bir vərəqədən digərinə keçməsi böyük ehtimalla enerjisi ATP ilə təmin olunan, Fəsil 11-də müzakirə edilən **flippaza** adlanan nəqliyyat zülalları tərəfindəın kataliz olunur.

Lipidlərin ikiqatlının bir üzündə daha böyük üstünlüklə yerləşməsi müxtəlif membran-əsaslı funksiyalar üçün lazımdır. Məsələn, ikinci mesencerlərin çox əhəmiyyətli mənbəyi fosfatidilinozitolun fosforlaşmış formada olan baş qrupları (bax Şəkil 7-8; PI) sitozola baxır. Çox hüceyrə-səthi reseptorlarının onlara uyğun olan liqandlarla stimullaşması sitozol fermenti fosfolipaza C-nin fəallaşması ilə nəticələnir, o da öz növbəsində fosfatidilinozitolları diasilqliseridlərə birləşdirən əlaqəni hidroliz edir. Fəsil 15-də bizim görəcəyimiz kimi, həm suda həll ola bilən fosfoinozitollar həm də membrana batmış diasilqliserol, hüceyrə metabolizminin çoxsaylı aspektlərinə təsir edən hüceyrədaxili siqnal sistemi yollarında iştirak edirlər. Fosfatidilserin də həmçinun, normal halda plazma membranının sitozol vərəqəsində zəngin olur. Trombositlərin zərdabla stimullaşmasının ilkin mərhələlərində fosfatidilserin, böyük ehtimalla flippazanın köməyi ilə qısa müddətdə eqzoplazmatik üzə translokasiya olunur və burada qan laxtalanmasında iştirak edən fermentləri fəallaşdırır. Hüceyrələr ölərkən lipidlərin asimmetriyası artıq saxlanılmır, normal halda sitozol vərəqində zəngin olan fosfatidilserin, artan şəkildə eqzoplazmatik vərəqdə tapılır. Bu guclənən təsir, xüsusi olaraq proqramlaşdırılmış hüceyrə ölümünün (apoptozun) başlanğıcını qiymətləndirmək üçün fosfatidilserinə birləşən Anneksin V zülalının nişanlanmış formasından istifadə etməklə eksperimental yolla aşkar edilmişdir. Ölməkdə olan və ya ölmüş hüceyrələrdə fosfatidilserinin artan təsiri, apoptoz olunmuş hsüceyrələri udan və beləliklə vaxtında ölmüş hüceyrə qalıqlarının təhlükəsiz şıkildə atılmasını təmin edən faqositoz hüceyrələri tərəfindən tanınır.

Xolesterin və Sfinqolipidlər Membran Mikrodomenlərində Spesifik Zülallarla Klaster Əmələ Gətirirlərr

Membran lipidləri, hər bir vərqədə və ya birqatlıda təsadüfi (bərabər qarışdırılmış) şəkildə paylanmamışdır. Lipidlərin vərəqə daxilində təşkil olunma ehtimalının bir ipucusu, plazma membranının qeyri-ion detergentlə, məsələn, Triton-X100 ilə ekstraksiyasından sonra qalmış lipidlərin əsasən iki növə – xolesterinə və sfinqomyelinə malik olmasının aşkar edilməsidir. Bu iki lipid daha nizamlı şəkildə, az mayeli ikiqatlıda tapıldığından, tədqiqatçılar fərz etdilər ki, onlar **lipid salları** (**lipid rafts**) adlanan mikrodomenləri əmələ gətirirlər və bunlar qeyri-ion detergentlə asanlıqla ekstraksiya oluna bilən, daha çox maye olan digər fosfolipidlərlə əhatə olumuşlar. (Biz, membran zülallarının ekstraksiyasında qeyri-ion və ion detergentlərin rolunu Bölmə 7.2-də daha dərindən müzakirə edirik.)

Bəzi biokimyəvi və mikroskopik dəlillər lipid sallarının mövcud olduğunu sübut edir, bunlar təbii membranlarda 50 nm diametrində olurlar. Sallar, xolesterini membrandan xüsusi olaraq ekstraksiya edən metil-β-tsiklodekstrinlə və ya membran daxilində xolesterini aqreqatlara ayıran filippin kimi antibiotiklə



ŞƏKİL 7-13 Lipid damlaları tumurcuqlamaq və kəsilməklə ER membrandan yaranır. Lipid damlalarının yaranması xolesterin efirlərinin və triqliseridlərin (sarı) lipid ikiqatlısının hidrofob özəyində toplanması ilə başlayır. İki lipid birqatlısının əmələ gəlmiş laylara ayrılması (delaminasiya) "linza"nın əmələ gəlməsinə səbəb olur, sferik damlaları əmələ gətirən sonrakı inkişaf damlaların kəsilərək ayrılması ilə nəticələnir.Yeni yaranmış damlalar, ER membranının sitozol vərəqəsindən əmələ gəlmiş lipid birqatlısı ilə əhatə olunur.

dağıdıla bilir. Belə kəşflər, bu salların bütövlüyünün saxlanılmasında xolesterinin əhəmiyyətini göstərir. Qeyri-ion detergentlərdə həll olunamamaları ilə təyin edilən belə sal fraksiyaları, plazma membran zülallarının bir çox hissəsinə malik olurlar və bunların çoxu hüceyrəxarici siqnalların tutulmasında və onların hüceyrə daxilinə, sitozola ötürülməsində iştirak edirlər. Sal fraksiyaları qlikolipidlərlə zəngin olduğundan, bütöv hüceyrələrdə sal-tipli quruluşların mikroskopik vizuallaşdırması üçün çox əhəmiyyətli olan bir alət fluoressent nişanlanmış, xüsusi olaraq müəyyən qanqliozidlərə birləşən zülalın, xolera toksinin istifadə olunmasıdır. Bir sıra əsas zülalların yaxın məsafəyə gətirilməsi ilə və onların qarşılıqlı əlaqələrini stabilləşdirməklə lipid sallar hüceyrə-səthi rseptorları vasitəsi ilə siqnal ötürülməsini və sitozoldakı sonrakı proseslərin fəallaşmasını mümkün edir. Amma, hələ də lipid salların quruluşu və bioloji fəaliyyəti barədə çox şeylər öyrənilməmiş qalır. Qlikolipidlər kimi sal-assosasiyalı bəzi lipidlərin unikal xüsusiyyətləri, onların quyruqlarının hidrofob özək boyunca qarşılıqlı təsirinə imkan verə bilər və siqnal platformalarının formalaşmasında sitozol vərəqəsində lipidlərin təşkil olunmasına kömək edə bilər.

Hüceyrələr Artıq Lipidləri Lipid Damlalarında Saxlayırlar

Lipid damlaları, triqliseroid və xolesterin efirlərindən təşkil olunmuş qovucuq quruluşlar olub ER-də yaranır və lipid-saxlanması kimi fəaliyyət göstərir. Hüceyrələrin lipid təchizatı onların membranın quruluşu üçün tələb olunan mövcud ehtiyacından artıq olanda, lipidlərin artıq hissəsi bu lipid damlalarına göndərilir, onlar da, canlı hüceyrələrdə Konqo qırmızısı kimi lipofil boya ilə rəngləməklə asanlıqla vizuallaşdırıla bilir. Hüceyrələrin yağ turşusunun bir tipi olan olein turşusu ilə qidalandırılması lipid damlalarının ənələ gəlməsini gücləndirir. Lipid damlaları yalnız triqliseridlərin və xolesterin efirlərinin saxlanma kompartmentindən ibarət deyil, o həmçinin parçalanmaq üçün ayrılmış zülalların saxlanılması platformasında da xidmət edir. Lipid damlalarının biogenezi, triqliserid və xolesterin efirlərinin yerləşdirilməsi yolu ilə ER-in lipid ikiqatlısının laylara ayrılması (delaminasiyası) ilə başlayır (Şəkil 7-13). Lipid linzalar, son anda ER-dən kəsilərək ayrılana qədər daha çox lipid daxil edilməklə böyüməkdə davam edirlər. Nəticədə əmələ gəlmiş sitoplazmatik lipid damla fosfolipid birqatlısı ilə bükülür. Lipid damlaların biogenezinin və eləcə də onların fəaliyyətinin detalları hələ də tam öyrənilməyib.

7.1 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Lipid İkiqatlısı: Tərkibi və Quruluşunun Təşkili

- Membranlar hüceyrənin quruluşu və fəaliyyəti üçün kritik əhəmiyyətlidirlər. Eukariotik hüceyrələr xarici mühitdən plazma membranla məhdudlaşırlar və membranla məhdudlaşan daxili kompartmentlərə (orqanoidlərə və qovucuqlara) ayrılırlar.
- Bütün membranların əsas quruluş vahidi fosfolipid ikiqatlısı, hidrofil üzləri və hidrofob özəyi olan iki-ölçülü lipid təbəqədən ibarət olub, suda-həll olan molekullar və ionlar üçün qeyri keçiricidir; ikiqatlının içərisinə yüklənmiş zülallar membranı spesifik funksiyalarla təmin edirlər (bax Şəkil 7-1).
- Fosfolipidlər spontan şəkildə ikiqatlını və su mühitini əhatə edən germetikləşmiş kompartmenti əmələ gətirirlər (bax Şəkil 7-3).
- İkiqatlılar kimi bütün membranlar daxili (sitozol) üzə və xarici (eqzoplazmatik) üzə malikdirlər (bax Şəkil 7-5). Bəzi orqanoidlər bir əvəzinə iki membran ikiqatlısı ilə əhatə olunmuşlar.

- Biomembranların əsas lipid komponentləri fosfoqliseridlər, sfinqolipidlər, və xolesterin kimi sterollardır. “Fosfolipid” termini, yağ asil karbohidrogen quyruğa və fosfat-əsaslı polyar baş qrupa malik olan istənilən amfipatik lipid molekuluna aid edilir (bax Şəkil 7-8).
- Membranlar, temperaturdan və membranın tərkibindən asılı olaraq mayeyə-bənzərdən gelə-bənzər vəziyyətə qədər faza keçidlərinə uğraya bililər (bax Şəkil 7-9).
- Lipidlərin əksəriyyəti və çox zülallar biomembranlarda lateral (yana) hərəkətlidirlər (bax Şəkil 7-10).
- Müxtəlif hüceyrə membranları lipid tərkibinə görə fərqlənirlər (bax Cədvəl 7-1). Fosfolipidlər və sfinqolipidlər ikiqatlının iki vərəqəsində asimmetrik paylandığı halda, xolesterin hər iki vərəqədə kifayət qədər bərabər paylanmışlar.
- Təbii biomembranlar adətən mayelilik xassəsi ilə özlü sabitliyə malikdir. Ümumiyyətlə, membran mayeliliyi sfinqolipidlər və xolesterinlə azalır, fosfoqliseridlərlə artır. Membranın lipid tərkibi onun qalınlığına və əyilmələrinə də təsir edir (bax Şəkil 7-11).
- Lipid sallar xolesterinə, sfinqolipidlərə və müəyyən membran zülallarına malik olan, ikiqatl müstəvisində formalaşan mikrodomenlərdir. Bu lipid-zülal aqreqatları, ola bilsin ki, müəyyən plazma membranı reseptorları ilə siqnal ötürülməsini asanlaşdırırlar.
- Lipid damcıları lipidlər üçün saxlama qovucuqlarıdır, əsasən ER-də yaranırlar (bax Şəkil 7-13).

10.2 Membran Zülalları: Quruluşu və Əsas Fəaliyyətləri

Membran zülalları fosfolipid ikiqatlısının daxilində və ya səthində yerlişməsi ilə müəyyən edilir. Hər bir bioloji membran eyni əsas ikiqatlı quruluşa malik olsa da, xüsusi bir membranla assosasiyada olan zülal bu membranın fərqli fəaliyyətini həyata keçirir. Membranlarla assosasiyada olan zülalların növləri və miqdarı hüceyrənin tipindən və subhüceyrə yerlişməsindən asılıdır. Məsələn, daxili mitoxondrial membranın 76 faizi zülallardır; sinir aksonlarını əhatə edən myelin membranlar isə 18 faiz zülallardır. Myelinin yüksək fosfolipid tərkibi, bizim Fəsil 22-də müzakirə edəcəyimiz kimi, siniri onu əhatə edən mühitdən elektrik cəhətdən izolyasiya edilməsinə imkan verir. Membran zülallarının əhəmiyyəti, maya genlərinin təxminən üçdə birinin membran zülallarını kodlaşdırmasının aşkar edilməsindən görünür. Membran zülallarının genlərinin nisbi zənginliyi çoxhüceyrəli orqanizmlərdə daha yüksəkdir, bu orqanizmlərdə membran zülalları hücerə adgeziyası və müxtəlif tipli hüceyrələrin kommunikasiyası (hücyrə-hüceyrə qarşılıqlı əlaqələri) kimi əlavə funksiyalara da malikdir.

Lipid ikiqatlısı membran zülalları üçün fərqli iki-ölçülü hidrofob mühiti təmsil edir. Bəzi zülallar fosfolipid ikiqatlısının hidrofob özəyinə yerləşmiş seqmenlərə malikdirlər, digər zülallar ikiqatlının sitozol və ya eqzoplazmatik vərəqələrinə birlişirlər. Plazma membranın hüceyrəxarici səthində zülal domenləri əsasən hüceyrəxarici molekullara, o cümlıdın xarici siqnal zülallarına, ionlara, və kiçik metabolitlərə (məsələn, qlükoza, yağ turşuları) və eləcədə başqa hüceyrələrdən olan və ya ətraf mühitdə olan zülallara birləşirlər. Plazma membranı daxilində zülal seqmentləri, molekulların və ionların hüceyrə xaricinə və daxilinə keçərək daşındığı kanalların və məsamələrin formalaşması kimi çoxsaylı funksiyaları, həyata keçirirlər. Membranlararası seqmentlər, çoxsaylı membran zülallarının membran müstəvisi daxilində böyük komplekslərdə toplammasının təşkilində də rol oynayırlar. Plazma membranının sitozol üzü boyunca uzanan domenlər, sitoskelet zülalların membrana lövbər etməsindən, hüceyrədaxili siqnal yollarının işə salınmasına qədər geniş diapozonda funksiyalara malikdirlər.

Çox hallarda, membran zülalarının funksiyası və membran daxilində onların polipeptid zəncirlərinin topologiyası, daha yaxşı xarakterizə olunmuş zülalarla onların oxşarlığına əsaslanaraq proqnozlaşdırıla bilər. Bu bölmədə biz membran zülallarının xarakterik quruluş xüsusiyyətlərini və onların bəzi əsas funksiyalarını tədqiq edirik. Biz, membran zülallarının membranla qarşılıqlı əlaqə yollarını anlamaqda sizə kömək etmək üçün bir sıra zülalların quruluşlarını təsvir edəcəyik. Müxtəlif tipli membran zülallarının xassələrinin daha tam təsviri sonrakı fəsillərdə, diqqəti onların hüceyrə funksiyası kontekstində quruluşları və fəaliyyətləri üzərində cəmləməklə verilmişdir.

Zülallar Membranlarla Üç Müxtəlif Yolla Qarşılıqlı Əlaqədə Olurlar

Membran zülalları, membranla münasibətdə onların yerləşməsinə əsasən üç kateqoriyada təsnifləşdirilir: inteqral, lipiddə lövbər edən və periferik zülallar (bax Şəkil 7-1). **İnteqral membran zülalları**, bunlara *transmembran zülallar* da deyilir, fosfolipid ikiqatlısına sarılırlar və üç seqmentdən təşkil olunublar. Sitozol və eqzoplazmatik domenlər, membranın sitozol və eqzoplazmatik üzündə su mühüti ilə qarşılıqlı təsirdə olan hidrofil xarici səthlərə malikdirlər. Bu domenlər aminturşu tərkibinə və quruluşuna görə suda həllolan başqa zülalların seqmentlərini xatırladırlar. Əksinə, membrana-sarınan seqmentlərində çoxsaylı hidrofob aminturşu qalıqlarına malik olurlar, bunların da yan zəncirləri kənara çıxaraq fosfolipid ikiqatlısının hidrofob karbohidrogen özəyi ilə qarşılıqlı əlaqəyə girirlər. Bu vaxta qədər yoxlanılmış bütün transmembran zülallarda membrana sarınmış domenlər bir və ya daha artıq α spiraldan və ya çoxsaylı β zəncirlərdən təşkil olunmuşdur. Biz Fəsil 5 və 10-da həll olan sitozol zülallarının ribosomlarda sintezini və posttranslyasiya prosessinqini müzakirə edirik; inteqral membran zülallarının sintezi prosesinin bir hissəsi kimi onların membrana daxil edilməsi prosesi Fəsil 13-də müzakirə olunur.

Lipiddə lövbər edən membarn zülalları bir və ya daha artıq lipid molekuluna kovalent rabitə ilə birləşirlər. Birləşdikləri lipidin hidrofob quyruğu membran vərəqəsinin birinə batmış (yüklənmiş) olur və zülalı membrana lövbər edir (bağlayır). Polipeptid zəncir özlüyündə fosfolipid ikiqatlısına girmir.

Periferial membran zülalları fosfolipid ikiqatlısının hidrofob özəyi ilə birbaşa əlaqədə olmur. Əksinə, onlar membrana dolayı yolla inteqral və ya lövbər edən zülallarla əlaqə yaradaraq birləşirlər, və ya birbaşa lipidin baş qrupları ilə

əlaqə yaradaraq birləşirlər. Periferial zülallar plazma membranın ya sitozol ya da eqzoplazmatik üzündə birlişə bilirlər. İkiqatlı ilə səx bağlı olan bu zülallardan başqa, sitoskelet filamentlər sitozol üzü ilə daha zəif şəkildə, adətən bir və ya daha artıq periferial adaptor zülallar vasitəsi ilə birləşə bilirlər. Sitoskeletlə bu cürə birləşmələr (assosasiyalar) müxtəlif hüceyrə membranlarına hüceyrənin formasının və mexaniki xassələrinin təyin edilməsi ilə yardım edir və bizim Fəsil 17-də öyrənəcəyimiz kimi, hüceyrənin daxili ilə xarici arasında ikitərəfli əlaqələrin yaranmasında rol oynayırlar. Nəhayət, plazma membranın xarici səthindəki periferial zülallar və inteqral membran zülallarının eqzoplazmatik domenləri çox zaman hüceyrəxarici matrisanın komponentlərinə və ya bakterial və bitki hüceyrələrini əhatə edən hüceyrə divarına yapışmış olurlar və hüceyrə ilə onun ətraf mühiti arasında mühüm interfeysi təmin edirlər.

Transmembran Zülalların Əksəriyyəti Membrana-Sarınmış α Spirallara Malik Olurlar

Həll olan zülallar yüzlərlə fərqli lokalizsiya olunmuş bükülmüş quruluşları və ya motifləri nümayiş etdirirlər (bax Şəkil 3-10). Müqayisədə, inteqral membran zülallarının transmembran domenlərində, hidrofob α spiralın dominantlıq etdiyi bükülmüş quruluşların repertuarı olduqca məhduddur. Membrana sarılmış α-spiral domenlərə malik olan zülallar, domendə hidrofob yan zəncirlərin spesifik lipidlərlə energetik cəhətdən əlverişli olan hidrofob və van-der-Vaals qarşılıqlı əlaqələrinə görə, həmçinin fosfolipidlərin polyar baş qrupları ilə ion əlaqələrinə görə stabil şəkildə membrana batmışlar.

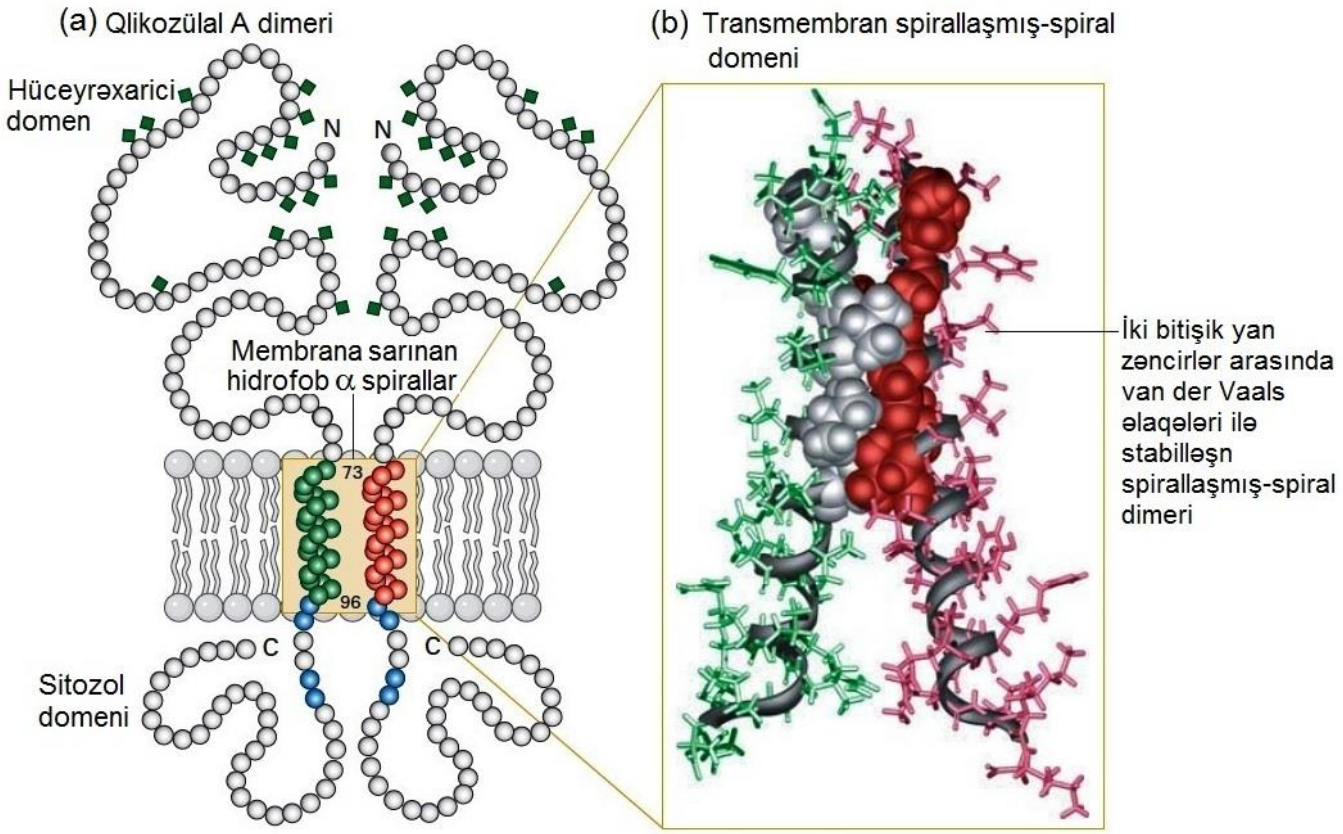
İnteqral membran zülalının membrana daxil olması üçün tək bir α-spiral domen kifayətdir. Amma, Zülalların əksəriyyəti birdən artıq transmembran α-spirala malikdirlər. Tipik olaraq, membrana-batmış α-spiral davam edən 20-25 hidrofob (yüksüz) aminturşu qalıqlarından ibarət oan seqmentdən təşkil olunmuşlar (bax Şəkil 2-14). Belə α-spiralın proqnozlaşdırılan uzunluğu (3.75 nm) fosfolipid ikiqalısının karbohidrogen zəncirinə sarınmasına kifayət edir. Çox membran zülallarında bu spirallar membran müstəvisinə perpendikulyar olduğu halda, bəzilərində membranı çəp bucaq altında keçir. Hidrofob yan zəncirlər spiraldan dik kənara çıxırlar və ikiqatlıda yağ asil zəncirləri ilə van-der-Vaals qarşılıqlı əlaqələrini yaradırlar. Əksinə, hidrofil amid peptid əlaqələri α-spiralın daxili tərəfindədir (bax Şəkil 3-4); hər bir karbonil (C═O) qrup spiralın C-sonluğu istiqamətində dördüncü amin turşusunun amid hidrogen aomu ilə hidrogen rabitəsi yaradır. Bu polyar qruplar membranın hidrofob daxilindən mühafizə olunurlar.

Zülalların α-spiral domenlərinin quruluşunu daha yaxşı anlamaqda sizə kömək üçün biz burada zülalların dörd müxtəlif növünün: qlikoforin A, G zülalla-cütləşən reseptorlar, akvaporinlər (su-qliserin kanalları) və antigen üçün T-hüceyrə reseptorunu qısaca müzakirə edəcəyik.

Eritrositlərin plazma membranının əsas zülalı qlikoforin A, bir dəfə-kəsib keçən transmembran zülalların nümayəndəsidir və yalnız bir membrana sarınan α-spirala malikdir (Şəkil 7-14). 23-qalıqdan ibarət olan membrana sarınan α-spiral, əhatə olunduğu ikiqatlıda yağ asil zəncirləri ilə qarşılıqlı əlaqə yaradan hidrofob yan zəncirlərə malik olan amin turşularından təşkil olunub. Hüceyrələrdə qlikoforin A adətən dimerləri əmələ gəirir: bir qlikoforin A polipeptidinin ransmembran spiralı ikinci qlikoforin A polipeptidin müvafiq transmembran spiralı ilə assosasia edir (bax Şkil 7-14b). Membrana sarınmış α spiralların belə qarşılıqlı əlaqələsi dimer membran zülallarının yaradılması üçün ümumi bir mexanizmdir və çox membran zülalları öz membrana sarınmış spiralları vasitəsi ilə qarşılıqlı əlaqəyə girərərk oliqomerləri (iki və daha artıq polipeptidin qeyri kovalent rabitə ilə birləşməsi) əmələ gətirirlər.

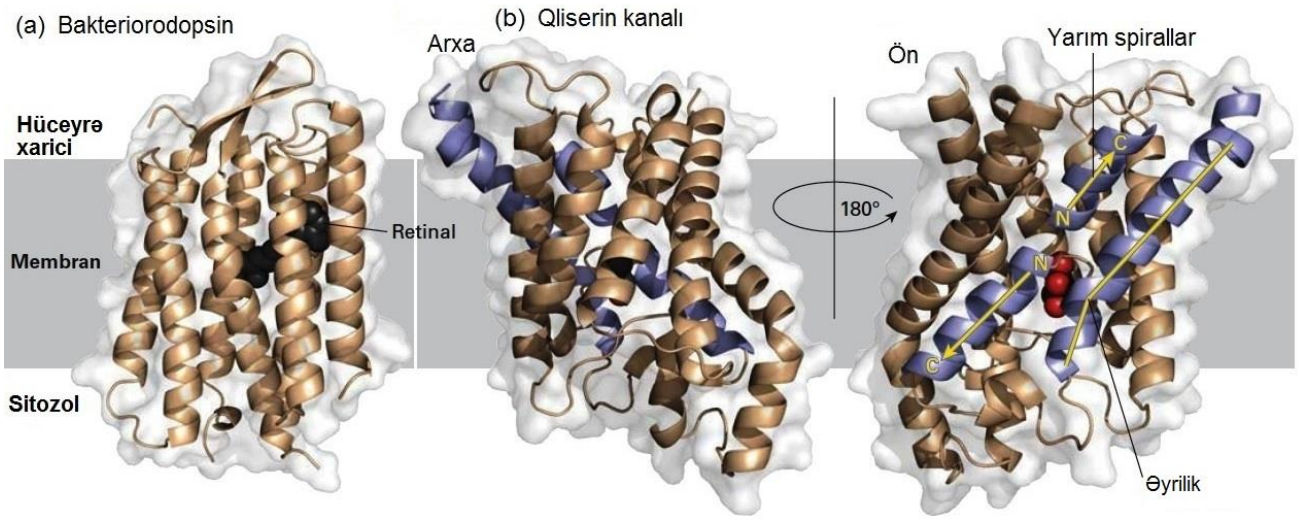
İnteqral membran zülallarının böyük və əhəmiyyətli bir qrupu onlarda olan yeddi transmembran α spiralın (heliksin) olması ilə müəyyən olunur. Bu qrupa, Fəsil 15-də müzakirə olunan, G zülallarla-cütləşən hüceyrə-səthi reseptorları daxildir və bunların böyük bir hissəsi artıq kristallaşdırılmışdır. Bu cürə *çoxkəsibkeçən* transmembran zülallardan biri, bəzi fotosintezedici bakteriyaların membranlarında tapılmış bakteriorodopsin zülalıdır, o, bütün bu zülalların əsas quruluşlarını özündə əks etdirir (Şəkil 7-15a). İşığın bu zülala kovalent birləşmiş retinal qrupu ilə udulması zülalda konformasiya dəyişikliyini əmələ gətirir, bu da protonun bakterial plazma membrandan keçərək sitozoldan hüceyrəxarici mühitə vurulmasına səbəb olur. Beləliklə, membranda yaranan proton qatılıq qradienti fotosintezin gedişi zamanı ATP sintezində istifadə olunur (Fəsil 12). Bakteriorodopsinin yüksək-rezolyusiyalı quruluşunda hər bir fərdi amin turşusunun, retinalın və ətrafdakı lipidlərin yerləşmə vəziyyəti dəqiq şəkildə müəyyən olunur. Gözlənildiyi kimi, virtual olaraq bakteriorodopsinin membrana-sarınan seqmentinin xarici tərəfindəki bütün amin turşuları hidrofobdurlar, və ətrafında olan lipid ikiqatlısının karbohidrogen özəyi ilə energetik cəhətdən sərfəli qarşılıqlı əlaqə yaratmağa imkan verirlər.

Akvaporinlər yüksək konservativ zülallar ailəsi olub suyun, qliserinin, və başqa hidrofil molekulların biomembranlardan keçərək daşınmasını həyata keçirirlər. Onlar, membranı çoxkeçən transmembran zülalların quruluşlarının bir sıra aspektlərini işıqlandırırlar. Akvaporinlər dörd eyni (identik) subvahidin tetrameridirlər. Dörd subvahidin hər biri membrana altı dəfə sarınan (6 transmembran) α spirala malikdir və bunlardan bəziləri membranı perpendikulyar əvəzinə çəpəki bucaq altında kəsib leçir. Bütün akvaporinlər oxşar quruluşa malik olduqlarından biz diqqətimizi onlardan birinin, quruluşu rentgen difraksiya tədqiqatları ilə çox yaxşı öyrənilmiş qliserin kanalı Glpf üzərində cəmləyəcəyik (Şəkil 7-15b). Bu akvaporin ortasında əyriliyi olan bir uzun transmembran spirala malikdir, və daha diqqətəlayiq olan odur ki, iki α spiral membranın yalnız *ortasına (yarısına) qədər* nüfuz edir. Bu spiralların N-sonluğu bir-birinə baxır (şəkildə sarı N-lər) və birlikdə onlar membrana çəp bucaq altında sarınırlar. Bləliklə bəzi membrana-batmış spirallar və bizim sonra rastlaşacağımız digər qeyri spiral quruluşlar ikiqatlını bütöv kəsib keçmir. Bizim Fəsil 11-də görəcəyimiz kimi, bu qısa spirallar akvaporində hər bir subvahidin ortasında qliserin/su-selektiv məsamələrin hissələrini əmələ gətirir. Bu quruluş, membrana-sarınmış α spiralların lipid ikiqatlısı ilə və zülalın başqa seqmentləri ilə qarşılıqlı əlaqə yolarının xeyli dərəcədə müxtəlif olduğunu işıqlandırır..

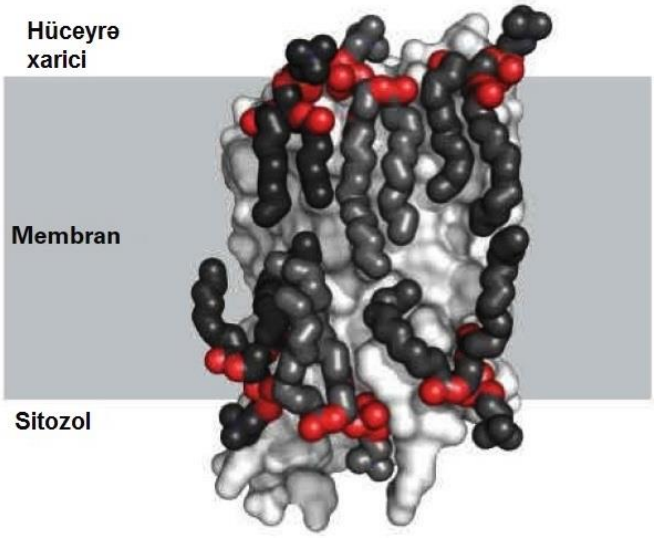


Şəkil 7-14 Bir dəfə-kəsib keçən transmembran zülal qlikoforin A-nın quruluşu. (a) Dimer qlikoforinin diaqramı onun əsas ardıcıllıq xüsusiyyətlərini və membrana münasibətini göstərir. Hər bir monomerdə 23 qalıqlı vahid membranı-keçən α-spiral hidrofob (yüksüz) yan zəncirlərə malik olan amin turşularından (qırmızı və yaşıl kürələr) təşkil olunmuşdur. Mənfi yüklənmiş fosfolipid baş qruplarına birləşməklə, müsbət yüklənmiş arginin və lizin (mavi kürələr) qalıqları spiralın sitozol kənarları yaxınlığında qlikoforinin membrana lövbər etməsinə kömək edir. Həm hüceрəxarici həm də siozol domenləri yüklənmiş qalıqlarla və polyar yüklənməmiş qalıqlarla zəngindir; hüceyrəxarici domen spesifik serin, treonin və asparagin qalıqlarına birləşmiş karbohidrat yan zəncirləri (yaşıl almazlar) ilə güclü şəkildə qlikozilləşmişdir. (b) Dimer qlikoforin A-nın 73-96-cı qalıqlarına uyğun olan transmembran domeninin molekulyar modeli. α-spiralın hidrofob yan zənciri bir monomerdə çəhrayı rəngdə göstərilmişdir, digər monomerdə olanlar isə yaşıl rəngdə göstərilmişdir. Fəza doldurulmuş quruluşlarda göstərilən qalıqlar van-der-Vaals qarşılıqlı əlaqələrində iştirak edirlər, bu da sirallaşmış-spiral dimeri stabilləşdirir. Hidrofob yan zəncirlərin spiraldan dik kənara, ətrafındakı yağ asil zəncirinə doğru necə çıxmalarına diqqət yetirin. [(b) hissəsi K.R. MacKenzie e al., 1997, *Science*, **276**:131, PDB ID 1afo.]

Fosfolipid-zülal qarşılıqlı əlaqələrinin spesifikliyi fərqli bir akvaporin, akvaporin 0-ın quruluşundan aydın olur (Şəkil 7-16). Akvaporin 0, məməlilərin gözündə linzanın əsas hissəsini təşkil edən lifli hüceyrələrin plazma membranında ən zəngin zülaldır. Başqa akvaporinlər kimi, o da eyni subvahidlərin tetrameridir. Zülalın səthi fosfolipid molekulları üçün eyni formalı birləşmə mərkəzlərinin dəsti ilə örtülməmişdir. Əksinə, yağ asil yan zəncirləri zülalın qeyri müntəzəm hifrofob xarici səthi üçün sıx şəkildə bükülmüşdür; bu lipidlər *həlqəvi fosfolipidlə*r hesab olunur, çünki onlar lipdin sıx üzük (halqa) formasını əmələ gətirirlər, bunlar da ikiqatlıda olan başqa fosfolipidlərlə asanlıqla dəyişilmirlər. Bəzi yağ asil zəncirləri, *trans* konformasiyada düzxətlidirlər (bax Fəsil 2), halbuki başqaları zülalın səthində olan bütün hidrofil yan zəncirləri ilə əlaqə yaratmaq üçün burulmuşlar. Bəzi lipid baş qrupları, təmizlənmiş fosfolipid ikiqatlısında olduğu kimi, membranın səthinə paraleldir. Amma, başqaları təxminən membran mstəvisinə düz bucaq altında yönəlmişlər. Beləliklə, fosfolipidlərlə membrana sarınan zülallar arsında spesifik qarşılıqlı əlaqələr mümkündür və əksər membran zülallarının fəaliyyətinə ikiqatlıda mövcud olan fosfolipidlərin spesifik tipi təsir edə bilir



ŞƏKIL 7-15 İki çoxkəsibkeçən membran zülallarının quruluş modeli. (a) Müəyyın bakteriyalarda olan bakteriorodopsin fotoreseptoru. Bakteriorodopsində yeddi hidrofob α spiral lipid ikiqalısını membran müstəvisinə təxminən perpendikulyar kəsib keçir. Spirallardan birinə kovalent birləşmiş retinal molekulu (qara) işığı udur. Eukariot hüceyrələrdə G zülallarla-cütləşən reseptorların böyük bir sinifi də yeddi membran-sarınan α spirala malikdir, belə hesab edilir ki, onların üç-ölçülü quruluşu bakeriorodopsininki ilə oxşardır. (b) Qliserin kanalı Glpf-in, membran müsəvisinə perpendikulyar aksis oxu boyunca bir-birinə nisbətdə 180º fırladılmış iki grünüşü. Çəp bucaq altında olan bir sıra membrana-sarınan α spirallara diqqət edək, iki spiral membranın yarısına qədər uzanmiş (sarı oxlarla bənövşəyi) və bir uzun membrana-sarınan spiral oratasında "qırıq" və ya əyrilik (bənövşəyi, sarı xətlərlə) vardır. Hidrofil "özəkdə" qliserin molekulu qırmızı ilə rənglənmişdir. Zülalın quruluşu təxminən membranın karbohidrogen özəyində, membran müstəvisinə perpendikular olan, zülalın 3-μm-lik ən hidrofob təbəqəsini taparaq yerləşmişdir. [(a) hissəsi H. Luecke et al., 1999, *J.Mol.Biol*. **291**:899-dan; (b) hissəsi J.bowie, 2005, Nature 438:581-589, və D.Fu et al., 2000, Science 290:481-486, PDB ID 1fx8.]

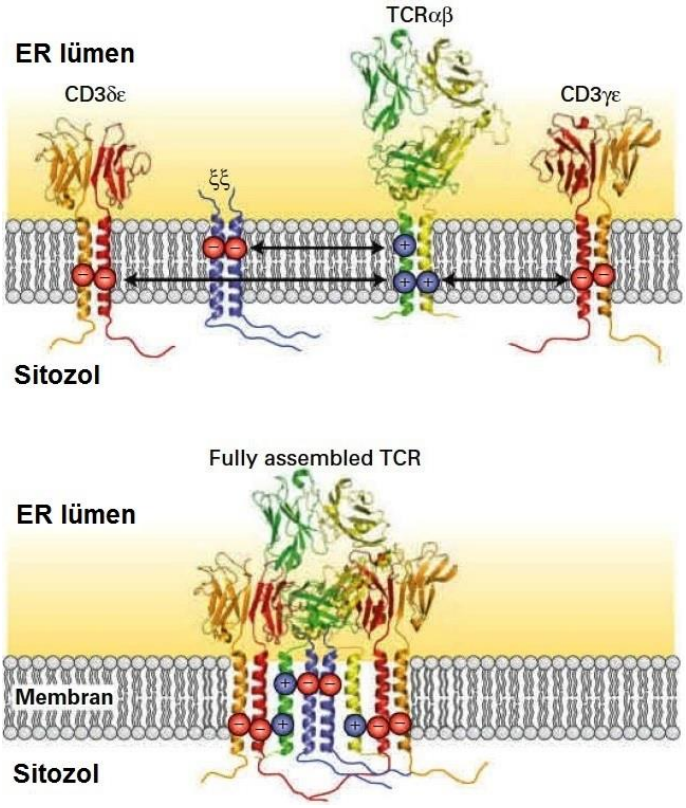


ŞƏKİL 7-16 Həlqəvi fosfolipidlər. 14 karbonlu doymuş yağ asil zəncirindən təşkil olunan fosfolipidlərə aid olan dimiristoilfosfatidilxolin fosfolipidinin iştirakı ilə kristallaşdırılmış linza-spesifik akvaporin 0 homotetramerin bir subvahidinin üç-ölçülü quruluşunun yandan görünüşü. Qeyd edək ki, lipid molekulları zülal ətrafında ikiqatlı qabığı əmələ gətirirlər. Zülal səth sahəsi kimi göstərilir (işıqlı fonda olan molekullar). Lipid molekulları fəza-doldurulmuş formatda göstərilir, polyar lipid baş qrupları (boz və qırmızı) və lipd yağ asil zəncirləri (qara və boz) zülal ətrafında təxminən eyni qalınlıqda olan ikiqatlını əmələ gətirirlər. Ehtimla olunur ki, membranda lipid yağ asil zəncirləri zülalın bütün hidrifob səthini ortür; kristalloqrafiya quruluşunda yalnız ən nizamlı lipid molekulları təyin edilir. [A.Lee, 2005, *Nature* **438**:569-570 və T.Gonen et al., 2005, *Nature* **438**:633:688, PDB ID 2b6o.]

İnteqral membran zülallarının ikiqatlıya batmasını həyata keçirən, əsasən hidrofob (yüklənməmiş) olan qalıqlardan başqa, çox α-spiral transmembran seqmentlər polyar və ya yüklü qalıqlara da malik olurlar. Onların amin turşusu yan zəncirləri, multimer membran zülallarının yığılması və stabilləşməsinin həyata keçirilməsində istifadə oluna bilər. Antigen üçün T-hüceyrə reseptoru bu hal üçün bir nümunədir: o dörd ayrıca dimerdən təşkil olunmuşdur, aralarındakı qarşılıqlı təsir, lipid ikiqatlısının karbohidrogen zəncirinin müvafiq "dərinliyində" α-spirallar arasında yük-yük qarşılıqlı əlaqə ilə həyata keçir (əkil 7-17). Hər bir dimerdə müsbət və mənfi yüklərin elektrostatik cazibəsi dimerlərin "bir-birini tapmasına" kömək edir. Beləliklə, başqa hidrofob transmembran seqmentlərində yüklənmiş qalıqlar multimer membran zülallarının qurulmasına kömək edə bilir.

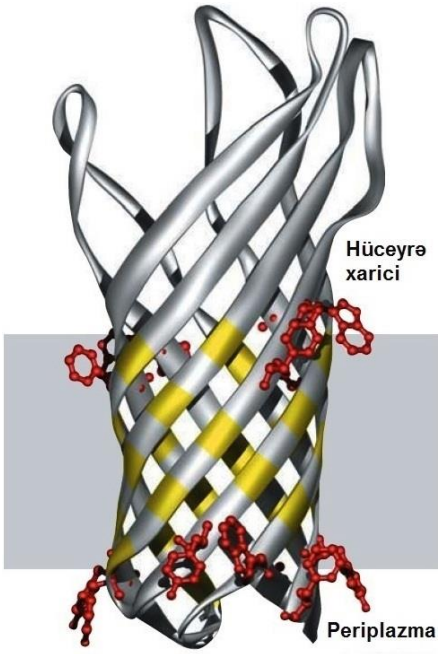
Porinlərdə Çoxsaylı β Zəncirlər Membrana-Sarınan "Çəlləkləriəri" Əmələ Gətirirlər

Porinlər transmembran zülalların sinifi olub quruluşu α-spirallı transmembran domenlərə əsaslanan digər integral zülalların quruluşundan köklü şəkildə fərqlənir. Bir neçə tip porin *E. coli* kimi qamma-mənfi bakteriyaların xarici membranında və mitoxondri ilə xloroplastların xarici membranlarında tapılmışdır. Xarici membran bağırsaq bakteriyalarını zərərli agentlərdən (məsələn, antibiotiklərdən, öd turşusu duzlarından və proteazalardan) mühafizə edir, amma kiçik hidrofil molekulların, o cümlədən qida maddələrinin və tullantıların udulmasına və atılmasına imkan verir. *E. coli* hüceyrələrinin xa-



ŞƏKİL 7-17 Yüklənmiş qalıqlar multimer membran zülallarının yığılmasını təşkil edə bilir. Antigen üçün T-hüceyrə reseptoru (TCR) dörd ayrıca dimerdən təşkil olunmuşdur: αβ cütü antigenin tanınması üçün birbaşa cavabdehdir və yardımçı subvaidlər ümumilikdə CD3 kompleks kimi adlandırılır. Bu yardımçı kompleksə γ, δ, ε və ζ subvahidlər axildirlər. ζ subvahidlər disulfid-əlaqəli homodimeri yaradırlar. γ və δ subvahidlər γε və δε cütlüklərini əmələ gətirmək üçün ε subvahidin olduğu kompleksdə ortaya çıxırlar. TCR α və β zəncirlərin transmembran seqmentlərinin hər biri müsbət yüklənmiş qalıqlara (mavi) malikdirlər. Bunlar, ikiqatlının hidrofob özəyində müvafiq dərinliklərdə mənfi yükü daşıyan (qırmızı) müvafiq γε və δε heterodimerlərin yığılmasına imkan verirlər. ζ heterodimer TCR α zəncirində yükə yan (docks) alır (tünd yaşıl), amma γε və δε subvahid cütləri hidrofob özəyin dərinliklərində həm cRα həm də TCRβ zəncirlərdə öz müvafiq şəriklərini (partnyorlarını) tapırlar (açıq yaşıl). Beləliklə, qeyri polyar transmrmbran seqmentlərin yüklənmiş qalıqları yüksək səviyyəli quruluşun yığılmasına kömək edə bilər. [Verilənlər K. W. Wucherpfennig et al., 2010, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**:a005140, PDB ID 1xmw; M. E. Call et al., 2006, *Cell*, **127**:355, PDB ID 2hac; and L. Kjer-Nielsen et al., 2003, *Immunity*, **18**:53, PDB ID 1mi5.]

rici membranında müxtəlif tipli porinlər xüsusi tipli disaxaridlərin və başqa kiçik molekulların, eləcə də fosfat kimi ionların keçməsi üçün kanalı təmin edir. Porinlərin aminturşu ardıcıllığı, α-spirallı membrana-sarınan domenlərə malik olan inteqral zülallar üçün tipik olan uzun fasiləsiz hidrofob seqmentlərə malik deyildir. Əksinə bu, tam bükülmüş porinin, lipid ikiqatlısının karbohidrogen özəyinə hidrofob xarakter göstərən bütöv xarici səthidir. Rentgen kristalloqrafiya göstərdi ki, porinlər identik subvahidlərin trimeridirlər. Hər bir subvahiddə, 16 β zəncir, mərkəzində məsamə olan boçka şəkilli quruluşda burulan bir vəraqi yradırlar (Şəkil 7-18). Tipik suda-həll olan qlobulyar zülaldan fərqli olaraq, porin hidrofil daxilə və hidrofob xaricə malikdir, bu mənada, porinlərin daxili xaricindədir (içi çölündədir). Porin monomerində, hər bir β-zəncirdə xaricə-baxan yan qruplar hidrofobdurlar və çəlləyin xaricində dövrə vuran qeyri-polyar lentşəkilli bənd əmələ gətirirlər. Bu hidrofob bənd membran lipidlərinin yağ asil qrupları ilə və ya başqa porin monomerləri ilə qarşılıqlı əlaqəyə girir. Porin monomerinin daxilinə baxan yan qruplar əsasən hidrofildirlər; onlar məsamələrdə elə düzülürlər ki, kiçik suda-həll olan molekullar membranı buradan keçirlər. (Qeyd edək ki, yuxarıda müzakirə olunan akvaporinlər, adlarına baxmayaraq porinlər deyillər və çoxsaylı α spirallara malikdirlər.)



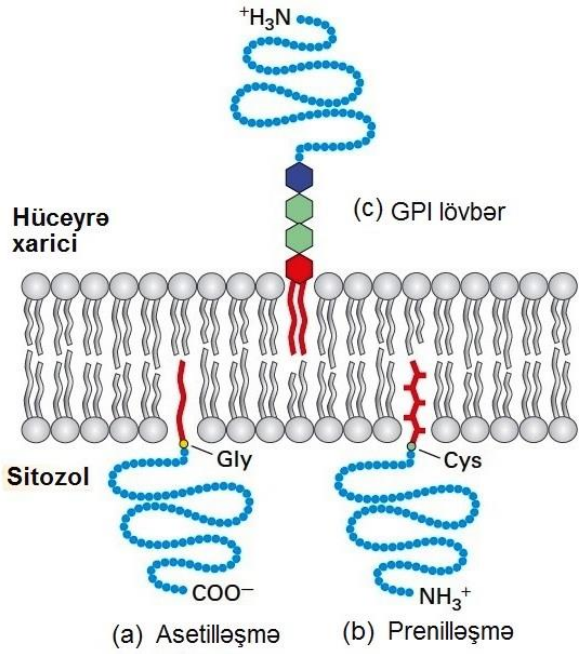
ŞƏKİL 7-18 *E. coli*-nin xarici membranında tapılmış OmpX porinin bir subvahidinin quruluş modeli. Bütün porinlər trimer transmembran zülallardırlar. Hər bir subvahid, β zəncirlərlə divarı əmələ gətirən və ortasında transmembran məsamə olan çəllək formasındadır. Alfatik (hidrofob və qeyri tsiklik) yan zəncirlərin qrupunun (sarı) və aromatik (halqaya malik olan) yan zəncirlərin (qırmızı) sərhəddi ikiqatlıda zülalın yerini müəyyən edir. Bsx G. E. Schulz, 2000, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**:443. [Verilənlər J. Vogt and G. E. Schulz, 1999, *Structure* **7**:1301, PDB ID 1qj8.]

Kovalent Birləşmiş Lipidlər Bəzi Zülalları Membrana Bağlayır

Eukariotik hüceyrələrdə, kovalent birləşmiş lipidlər, bir qayda olaraq bir sıra suda-həll olan zülalları membranın bu və ya digər vərəqəsinə bərkidə bilir. Bu cürə lipidə-bərkidilən zülallarda, lipidin karbohidrogen zəncirləri ikiqatlıya batırlar, amma zülal özlüyündə ikiqatlıya batmır. Zülalları sitozol üzünə bərkitmək üçün istifadə olunan lipid lövbərlər eqzoplazmatik üzdə bərkitmək üçün istifadə olunmur və ya əksinə.

Sitozol zülallarının bir qrupu N-terminal qlisin qalığına kovalent birləşmiş yağ asil qrupları ilə (məsələn, miristat və ya palmitat) membranın sitozol üzünə lövbər etmişdir və bu proses

asilləşmə adlanır (Şəkil 7-19a). Bu cürə zülalların membranda N-sonluqlu asil lövbərlə tutulması membranla-əlaqəli fəaliyyət üçün əhəmiyyətli rol oynaya bilir. Məsələn, hüceyrənin tirozin kinazasının v-Src mutant forması, sonda xərçəngə apara bilən qeyri normal hüceyrə inkişafını induksiya edir, amma bu yalnız N-sonluq miristilləşəndə baş verir.



ŞƏKİL 7-19 Plazma membranı zülallarının kovalent rabitəli karbohidrogen qrupları ilə ikiqatlıya birləşdirilməsi. (a) v-Src kimi sitozol zülalları, polipeptidin N-sonluq qlisin (Gly) qalığına birləşmiş tək yağ asil zənciri vasitəsi ilə plazma membranı ilə assosasiya edir. Miristat (C14) və palmitat (C16) ümumi asil lövbərdirlər. (b) Başqa sitozol zülalları (məsələn, Ras və Rab zülalları) C-sonluqda və ya C-sonluğa yaxın olan bir və ya iki sistein (Cys) qalıqlarının prenilləşməsi ilə membrana lövbər etmişlər. Lövbərlər farnezil (C15) və geranilgeranil (C20) qruplardır, hər ikisi doymamış yağ turşusudur. (c) Plazma membranın eqzoplazmatik səthində **lipid** lövbər qlikozilfosfatidilinozitoldur (GPI). Lövbərin fosfatidilinozitol hissəsi (qırmızı) ikiqatlının daxilinə uzanan iki yağ asil zəncirinə malikdir. Lövbərdəki fosfoetanolamin hissə (çəhrayı) onu zülalla əlaqələndirir. İki yaşıl altıbucaqlı, sayına, təbiətinə və müxtəlif GPI lövbərlərdə düzülüşünə görə fərqlənən şəkər hissələrini göstərir. Maya GPI lövbərlərin tam quruluşu Şəkil 13-15-də göstərilir. Bax H.Sprong et al., 2001, *Nature Rev.Mol.Cell Biol*. **2**:504.

Sitozol zülallarının ikinci qrupu C sonluğunda və ya C-sonluğu yaxınlığında olan sistein qalığına birləşmiş karbohidrogen zəinciri vasitəsi ilə membrana bağlanır və bu proses *prenilləşmə* adlanır (Şəkil 7-19b). Prenil lövbər 5-karbonlu izopren vahiddən qurulmuşdur və növbəti bölmədə ətraflı verildiyi kimi, xolesterinin sintezində istifadə olunur. Prenilləşmədə 15-karbonlu farnezil və ya 20-karbonlu geranilgeranil qrupu tioefir əlaqələri ilə, adətən zülalın C-sonluqlu Cys-Ala-Ala-X (X-amin turşularının istənilən biri) və ya CAAX boksunun bir hissəsi olan C-sonluqlu sistein qalığının ─SH qrupuna birləşir. Prenilləşmə baş verdikdən sonra C-sonluqlu Ala-Ala-X motif proteoliz yolu ilə uzaqlaşdırıla (atıla) bilir. Bəzi hallarda, ikinci geranilgeranil qrupu və ya yağ asil palmitat qrupu yaxınlıqdakı sistein qalığı ilə əlaqə yaradır. Guman olunur ki, əlavə karbohidrogen lövbər zülalın membrana birləşməsini gücləndirir. Məsələn, hüceyrədaxili siqnal sistemində iştirak edən GTP-aza superailəsi zülalı olan Ras (Fəsil 15) bu cürə ikiqat lövbər ilə plazma membranın sitozol üzünə cəlb edilir. GTP-aza superailəsi zülallarına aid olan Rab zülalları da, eynilə hüceyrədaxili qovucuqların sitozol səthinə prenil lövbər ilə birləşirlər; bu zülallar qovucuqların öz hədəf membranına qovuşması üçün tələb olunurlar (Fəsil 14). Hələ də, digər zülallar başqa lipid modifikasiyaları olmadan membrana-yaxın sistein qalıqlarında palmitilləşirlər.

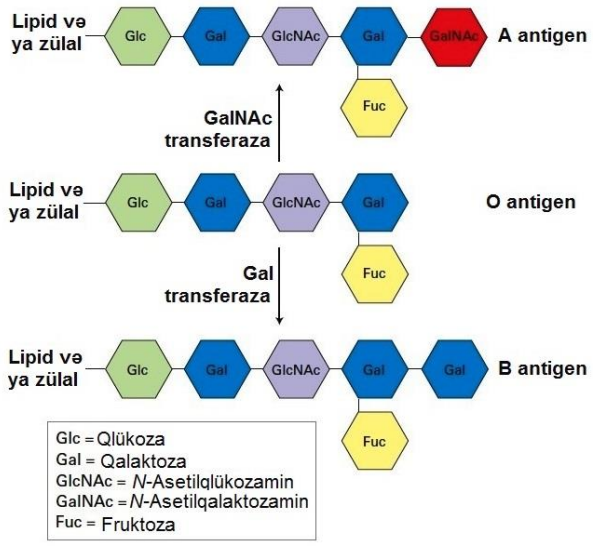
Bəzi hüceyrə-səthi zülalları və proteoqlikanlar adlanan fərqli polisaxaridlərlə kovalent birləşən xüsusiləşmiş zülallar (bax Fəsil 20) üçüncü tip lövbər qrupu qlikozilfosfatidilinozitol (GPI) ilə plazma membranın eqzoplazmatik səthinə birləşirlər. *GPI lövbərlərin* dəqiq quruluşu müxtəlif hüceyrə tiplərində güclü şəkildə fərqlənirlər, amma onların həmişə, membran fosfolipidlərində olduğu kimi iki yağ asil zənciri tipik lipid ikiqatlısının daxilinə uzanan fosfatidilinozitol (PI) qrupuna, zülalın C-sonluğuna kovalent rabitə ilə lövbər edən fosfoetanolaminə və bir sıra şəkər qalıqlarına malik olur (Şəkil 7-19c). Buna görə də, GPI lövbərlər qlikolipidlərdir. GPI lövbər zülalın membrana birləşməsi üçün həm lazımdır, həm də kifayət edir. Məsələn, hüceyrələrin, fosfolipidlərdə və GPI lövbərlərindəki fosfat-qliserin əlaqəsini parçalayan fosfolipaza C ilə işlənilməsi (bax Şəkil 7-12) Thy-1 və plasental qələvi fosfatazsı (PLAP) kimi GPI-lövbər salmış zülalları hüceyrə səthindən ayırıb buraxır.

Bütün Transmembran Zülallar və Qlikolipidlər İkiqatlıda Asimmetrik Yönəlmişlər

Transmembran zülalların hər bir tipi, membranın üzlərinə münasibətdə, *topologiya* kimi məlum olan xüsusi yönümə malikdir. Onun sitozol seqmentləri həmişə sitoplazmaya baxır, eqzoplazmatik seqmentləri isə həmişə membranın əks tərəfinə (xaricinə) baxır. Zülalların yönəlməsində (orientasiyasında) belə asimmetriya membranın iki üzünə müxtəlif xassələri verir. Müxtəlif tipli transmembran zülalların yönəlməsi, bizim Fəsil 13-də müzakirə edəcəyimiz kimi, onların sintezi zamanı müəyyən olunur. Membran zülallarının otərəfə-butərəfə (şap-şup - flip-flop) keçməsi heç vaxt müşahidə olunmamışdır; bu cürə keçmə hidrofil amin turşu qalıqlarının membranın hidrofob daxilindən keçici yerdəyişməsini tələb edir, bu da energetik cəhətdən sərfəli deyildir. Buna görə, transmembran zülalların, asimmetrik topologiyası zülalın bütün həyatı boyu saxlanılır. Şəkil 7-6-da göstərildiyi kimi, membran zülalları membranda öz asimmetrik yönümlərini membran tumurcuqlaması və qovuşması hadisələrində də saxlayırlar; eyni seqment bütün hallarda sitoplazmaya baxır və eyni seqment də həmişə eqzoplazmaya baxır. Çox kəsibkeçən transmembran zülalları fərdi transmembran seqmentlərinin yönəminə membranın fosfolipid tərkibindəki dəyişikliklər təsir edə bilər.

Çox transmembran zülallar polipeptiin serin, treonin və ya asparagin qalıqlarının yan zəncirlərinə kovalent birləşmiş karbohidrat zəncirlərinə malik olurlar. Belə transmembran **qlikozülallar** həmişə elə yönəlirlər ki, bütün karbohidrat zəncirlər eqzoplazmatik domendə qalırlar (qlikoforin A-nın

numunəsi üçün Şəkil 7-14 bax). Eləcə də, karbohidrat zəncirinin membran lipidinin qliserin və ya sfinqozin özülünə birləşdiyi qlikolipidlər həmişə membranın eqzoplazmatik vərəqəsində yerləşirlər və karbohidrat zənciri membran səthindən dik çıxmış (sallanmış) vəziyyətdə olur. Zülalların asimmetrik qlikozilləşməsinin biosintetik əsasları Fəsil 14-də təsvir olunur. Həm qlikozülallar həm də qlikolipidlər xüsusən eukariot hüceyrələrin plazma membranlarında, həmçinin ifrazat və endositik yolları yaradan hüceyrədaxili kompartmentlərin membranlarında geniş yayılmışlar; onlar daxili mitoxondrial membranlarda, xloroplast lamellalarında və bir sıra başqa hüceyrədaxili membranlarda yoxdurlar. Qlikozülalların və qlikolipidlərin karbohidrat zəncirləri plazma membranında hüceyrəxarici fəzaya çıxdığından, onlar hüceyrəxarici matrisa ilə, eləcə də lektinlərlə (spesifik şəkərləri birləşdirən zülal), boy faktorları ilə və anticismlərlə əlaqə yarada bilirlər.



ŞƏKİL 7-20 İnsanın ABO qan qrupu antigenləri. Bu antigenlər, plazma membranında qlikolipidlərə və ya qlikozülallara kovalent birləşmiş oliqosaxarid zəncirləridir. Terminal oliqosaxarid şəkərləri üç antigeni fərqləndirirlər. Qalaktozanı (Gal) və ya N-asetilqalaktozamini (GalNac) O antigeninə əlavə edən qlikoziltransferazalara malik olmaq və ya malik olmamaq fərdin qan tipini təyin edir.

Membran qlikozülallarının və qlikolipidlərinin daxil olduğu belə qarşılıqlı əlaqənin əhəmiyyətli bir nəticəsi ABO qan-qrupu antigenləri ilə təsvir olunur. Müəyyən qlikozülaların və qlikolipidlərin quruluuna görə bir-birinə çox yaxın olan üç oliqosaxarid komponenti insanın qırmızı qan hüceyrələrinin və çoxsaylı başqa hüceyrə tiplərinin səthində ekspressiya olunurlar (Şəkil 7-20). Bütün insanlarda O antigenini sintez etmək üçün ferment vardır. A tipi qanına malik olan insanlar həmçinin qlikoziltransferaza fermentinə də malikdirlər, bu ferment A antigenini yaratmaq üçün *N*-asetilqalaktozamin adlanan ekstra modifikasiya olunmuş monosaxaridi O antigeninə əlavə edir. B tipi qanına malik olan insanlar, B antigenini əmələ gətirmək üçün əlavə qalaktozanı O antigeninə əlavə edən fərqli transferazaya malikdirlər. Hər iki transferazaya malik olan insanlar həm A həmdə B antigenini istehsal edirlər (AB qan tipi); bu transferazaların hər ikisinə malik olmayanlar isə yalnız O antigenini istehsal edirlər (O qan tipi).

Eritrositlərinin səthində A antigeninə və ya B antigeninə və yaxud hər ikisinə malik olamyan insanlar normal halda qan zərdablarında itmiş antigenlərin hər ikisinə qarşı anticismlərə malik olurlar. Beləliklə, əgər A və ya O tipli şəxslər B qan tipindən qanköçürməyə məruz qalarsa B antigeninə qarşı olan anticismlər daxil edilmiş qırmızı qan hüceyrələrinə birləşəcək və onların parçalanmasına səbəb olacaq. Belə zərərli raksiyanın qarşısını almaq üçün qan qruplaşmaları və qan donrlarının və qan alanların müvafiq uyğun-gəlmələri bütün qan köçürmələri zamanı tələb olunur (Cədvəl 7-2).

Lipid-Birləşdirən Motiflər Periferial Zülalları Membrana Hədəf Etməyə Kömək Edir

Substratları fosfolipidlər olan bir çox suda-həllolan fermentlər membran səthinə birləşməlidirlər. Məsələn, fosfolipazalar fosfolipidlərin baş qrupunda müxtəlif rabitələri hidroliz edirlər (bax Şəkil 7-12), beləliklə də hüceyrələrdə zədələnmiş və ya qocalmış hüceyrə membranlarının parçalanmasına kömək eməklə, siqnal molekullarının sələflərini yaratmaqla, hətta çox ilan zəhərlərində fəal komponent kimi iştirak etməklə müxtəlif rol oynayırlar. Fosfolipazalar da daxil olmaqla bir çox belə fermentlər katalitik funksialarını həyata keçirmək üçün ilkin olaraq membran fosfolipidlərinin polyar baş qrupuna birləşirlər. Fofolipaza A_2-nin təsir mexanzmi suda-həll olan belə fermentlərin membranla necə geriyə dönən qarşılıqlı əlaqədə olmalarını və su məhlulu ilə lipid səthi arasında reaksiyanı kataliz etmələrini izah edir. Bu ferment su məhlulunda olarkən onun Ca^{2+}-saxlayan fəal mərkəzi hidrofob amin turşularının düzülüşündən ibarət olan kanalın içində örtülür. Ferment ən yüksək affinnliklə mənfi yüklənmiş fosfolipidlərdən (məsələn, fosfatidilserindən) ibarət olan ikiqatlılara birləşir. Bu müşahidələr göstərir ki, katalitik kanalın girişi ətrafında müsbət yüklənmiş lizin və arginin qalıqlarının kənarı birləşmək üçün xüsusən əhəmiyyətlidir (Şəkil 7-21a) və lipid birləşmə motifini əmələ gətirir. Birləşmək fosfolipaza A_2-nin konformasiya dəyişikliyini induksiya edir, bu da onun fosfolipidlərin baş qrupuna birləşməsini möhkəmləndirir və hidrofob kanalı açır. Fosfolipid molekulu ikiqatlıdan kanala keçən kimi, fermentlə birləşmiş Ca^{2+} baş qrupdakı fosfata birləşir, bununla da katalitik mərkəzdə kəsilməli olan efir əlaqəsinin yerini təyin edir (Şəkil 10-21b), beləliklə də asil zəncirini azad edir.

Zülallar Membrandan Detergentlərlə və ya Yüksək-Duz Məhlulu İlə Çıxarıla Bilir

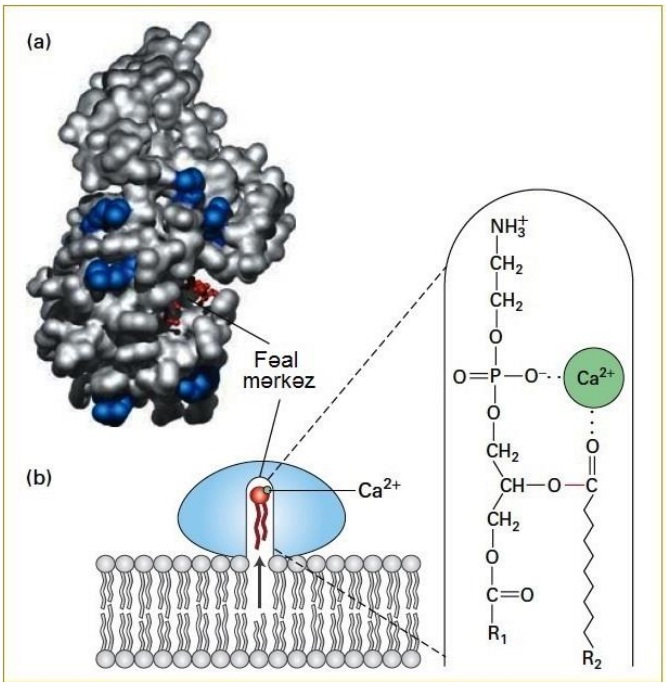
Çox hallarda membran zülallarını, onların membran lipidləri və digər membran zülalları ilə xüsusən sıx assosasiyalarına görə ayırıb təmizləmək və öyrənmək çətin olur. *Detergentlər* amfipatik molekullar olub fosfolipid ikiqatlısı ilə qarşılıqlı əlaqəyə girərərk membranı dağıdır, ona görə də lipidlərin və çox membran zülallarının həll edilməsində istifadə oluna bilirlər. Detergent molekulunun hidrofob hissəsi fosfolipid karbohidrogenləri tərəfindən cəzb olunur və asanlıqla onlarla qoşulur; hidrofil hissəsi isə güclü surətdə su tərəfindən cəzb

olunur. Öd turşusuniun duzu kimi bəzi detergentlər təbii məhsullardır, amma ərzaq sənayesində yağların və suyun dispers qatışılqlarını təmizləmək üçün çoxsaylı sintetik molekullar yaradılıb inkişaf etdirilmişdir (məsələn, krem şəkilli yerfındığı yağı) (Şəkil 7-22). Natrium dezoksixolat (öd duzu) və natrium dodesilsufat (SDS) kimi ionlaşan detergentlər yüklənmiş qruplara malik olurlar; Triton X-100 və oktilqlikozid kimi ionlaşmayan detergentlər yüklənmiş qruplara malik olmurlar. Çox aşağı qatılıqlarda, detergent təmiz suda ayrılmış molekul kimi həll olur. Qatılığı artdıqca molekul misellər – kiçik kürəşəkilli aqreqatları yaratmağa başlayırlar, bunlarda da molekulun hidrofil hissəsi xaricə baxır, hidrofob hissə isə daxildə klastr əmələ gətirir (bax Şəkil 7-3c). Misellilərin hər bir detergent üçün xarakterik yarandığı *kritik miselli qatılığı* (*CMC*) onun hidrofob və hidrofil hissələrinin quruluşunun funksiyasıdır.

Cədvəl 7-2 ABO qan qrupları

Qan qrupu	RBClərin antigeni*	Zərdab anticismi	Qan tipini ala bilir
A	A	Anti-B	A və O
B	B	Anti-A	B və O
AB	A vəB	Heçbiri	Hamısı
O	O	Anti-A və Anti-B	O

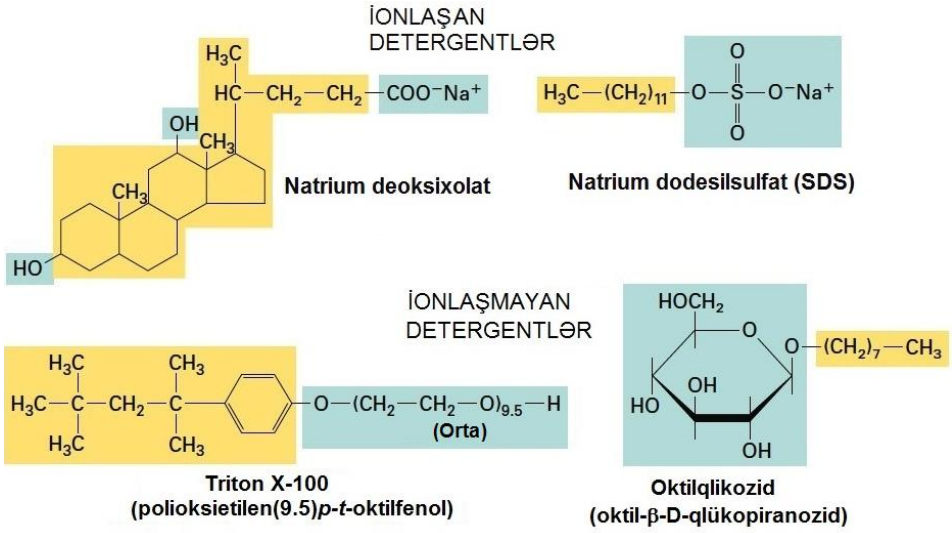
*Antigenin quruluşu üçün Şəkil 7-20-ə bax



İonlaşan və ionlaşmayan detergentlər zülallarla fərqli qarşılıqlı əlaqədə olurlar və laboratoriyada müxtəlif istifadələrdə tətbiq olunurlar. İonlaşan detergentlər membran zülalının açıqda qalan hidrofob rayonuna və eləcə də suda-həll olan zülalların hidrofob özəyinə birləşirlər. Bu detergentlər yüklərinə görə ion və hidrogen rabitələrini qıra bilirlər. Yüksək qatılıqlarda detergentlər, məsələn, natrium dodesil sulfat, bütün yan zəncirlərə birləşməklə zülalları tamamilə denaturasiya edir və onun bu xüsusiyyətindən SDS-gel elektroforezində istifadə olunur (bax Şəkil 3-38). Qeyri-ion (ionlaşmayan) detergentlər əsasən zülalları denaturasiya etmir və ona görə də, zülalları təmizləməkdən öncə onların bükülmüş fəal formalarında membrandan ayrılmasında istifadə üçün sərfəlidirlər. Zülal-zülal qarşılıqlı əlaqələri, xüsusən də zəif əlaqələr həm ion həm də qeyri ion detergentlərə həssas olurlar.

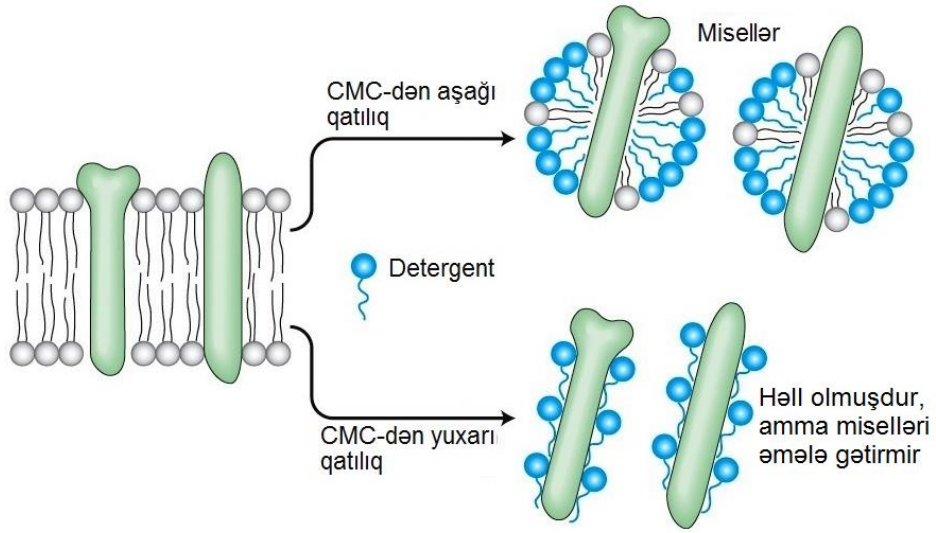
İonlaşmayan detergentlər yüksək qatılıqlarda (CMC-dən yuxarı), detergentlərin, fosfolipidlərin və inteqral membran zülallarının qatışığından ibarət olan, su məhlulunda həll olmayan həcimli hidrofob quruluşlardan ibarət olan misellər qatışığını əmələ gətirərək (Şəkil 7-23 *yuxarıda*) bioloji membranları həll edirlər. Aşağı qatılıqlarda (CMC-dən aşağı), bu detergentlər, misselliləri əmələ gtəirmədən inetqral membran zülallarının əksəriyyətinin hidrofob rayonlarına birləşir və onlara su məhlulunda həll olmuş vəziyyətdə qalmağa imkan verir (Şəkil 7-23, *aşağıda*). İnteqral membran zülallarının belə su məhlulunun yaradılması zülalların təmizlənməsinin ilkiin mərhəlləsində vacibdir.

ŞƏKIL 7-21 Fosfolipaza A-nın lipid birləşdirən səthi və fəaliyyət mexanizmi. (a) Fermentin membranla qarşılıqlı əlaqədə olan səthini göstərən quruluş modeli. Bu lipid birləışdirən səth, katalitik fəal mərkəzin boşluğunun əhatəsində göy rənglə göstərilən, müsbət yüklənmiş arginin və lizin qalıqlarının çənbərinə malikdir, buraya substrat lipid (qırmızı şar-və-çöpşəkilli quruluş) birləşmişdir. (b) Fosfolipaza A_2 ilə katalizin diaqramı. Lipid membranı üzərində oturarkən, birləşdirmə saytının müsbət yüklənmiş qalıqları membran səhində mənfi yüklənmiş polyar qruplara birləşir. Bu birləşmə, kiçik konformasiya dəyişikliyini edir, lipid ikiqatlısından katalitik mərkəzə qədər uzanan hidrofob amin turşularının düzülüşündən ibarət olan kanalın açılmasına səbəb olur. Fosfolipid kanala keçən kimi, fermentə birləşmiş Ca^{2+} ionu (yaşıl) baş qrupa birləşir, katalitik mərkəzin ardınca gələn kəsilməli olan efir (qırmızı) əlaqəsini tapır. Bax D. Blow, 1991, *Nature* **351**:444, and M. H. Gelb et al., 1999, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**:428. [(a) hissəsi D. L. Scott et al., 1990, *Science* **250**:1563, PDB ID 1poc-dan.]



ŞƏKİL 7-22 Dörd çox istifadə olunan detergentin quruluşu. Hər bir molekulun hidrofob hissəsi sarı rəngdə hidrofil hissəsi isə mavi rəngdə göstərilmişdir. Öd turşusunun duzu natrium dezoksixolat təbii məhsuldur, başqaları isə sintetikdir. Hərçənd ki, ionlaşan detergentlər ümumən zülalların denaturasiyasına səbəb olurlar, ionlaşmayan detergentlər isə olmurlar və ona görə də, membran zülallarının həll olunmasında sərfəlidirlər.

Əvvəllər müzakirə olunduğu kimi, periferial membran zülallarının əksəriyyəti xüsusi transmembran zülallara və ya membran fosfolipidlərinə ion və ya başqa zəif qeyri kovalent qarşılıqlı əlaqələrlə birləşirlər. Ümumiyyətlə, periferial zülallar, ion əlaqələrini qıran yüksək ion gücünə malik olan məhlullarla (yüksək duz qatılıqları) və ya Mg^{2+} kimi ikivalentli kationları birləşdirən kimyəvi maddələrlə membrandan uzaqlaşdırıla bilər. İnteqral zülallardan fərqli olaraq periferial zülalların əksəriyyəti su məhlulunda həllolandırlar və ionlaşmayan detergentlərlə həll edilməyə ehtiyac yoxdur.



ŞƏKİL 7-23 İnteqral membran zülallarının ionlaşmayan detergentlərlə həll olunması. Detergent kritik miselli qatılığından (CMC) yüksək qatılıqda lipidləri və inteqral membran zülallarını həll edir və detergent, zülal və lipid molekullarından ibarət olan qatışıq misellini yaradır. CMC-dən aşağı qatılıqda ionlaşmayan detergentlər (məsələn, oktilqlikozid, Triton X-100) miselliləri əmələ gətirmədən membran zülallarını və membrana-sarınan rayonları örtməklə (əhatəetməklə) həll edirlər.

7.2 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Membran Zülalları: Quruluşu və Əsas Fəaliyyətləri

- Bioloji membranlar adətən inteqral (transmembran) zülallara, eləcə də lipidlə-lövbər edən zülallara və ikiqatlının hidrofob özəyinə daxil olmayan periferial membran zülallarına malik olurlar (bax Şəkil 7-1)
- İnteqral membran zülallarının əksəriyyəti membrana sarınan, ucları membranın sitoplazmatik və eqzoöplazmatik üzlərini əhatə edən sulu mühitə uzanan hidrofil domenlərlə birləşmiş bir və ya daha artıq hidrofob α spirala (heliks) malik olurlar (bax Şəkillər 7-14, 7-15 və 7-17).
- Yağ asil yan zəncirləri və eləcə də membran lipidlərinin polyar baş qrupları sıx və qeyri müntəzəm şəkildə inteqral membran zülallarının hidrofob seqmentləri ətrafında bükülürlər (bax şəkil 7-16).
- Porinlər, başqa inteqral zülallardan fərqli olaraq membrana sarınmış β vərəqlərə malikdirlər, bunlar lipd ikiqalısında çəlləyə-bənzər kanalları yaradırlar (bax şəkil 7-18).
- Muüəyyən amin turşularına qoşulmuş lipidlər bəzi zülalları bu və ya digər membran vərəqələrinə lövbər edirlər (bax Şəkil 7-19).
- Bütün transmembran zülallar və qlikolipidlər ikiqatlida asimmerik yönəlmişlər. Karbohidrat zəncirlər dəyişilməz

şəkildə qlikozülalların və qlikolipidlərin yalnız eqzoplazmatik səthində mövcud olurlar.

- Suda həll olan çox fermentlər (məsələn, fosfolipazalar) fosfolipidləri subsrat kimi isifadə edirlər və onlar öz fəaliyyətlərini həyata keçirmək üçün membran səthinə birləşməlidirlər. Bu cürə birləşmə çox hallarda zülaldakı əsasi qalıqların müsbət yükləri ilə ikiqalıdakı fosfolipidin baş qrupunun mənfi yükləri arasındakı cazibə nəticəsində baş verir.
- Transmembran zülallar ionlaşmayan detergentlərdən istifadə etməklə selektiv şəkildə membrandan ekstraksiya olunaraq təmizlənirlər.

7.3 Fosfolipidlər, Sfinqolipidlər və Xolesterin: Sintezi və Hüceyrədaxili hərəkətləri

Bu bölmədə biz hüceyrə daxilinin su mühütində pis həll olan lipidlərin sintezində və daşınmasında hüceyrələrin qarşılaşdığı xüsusi problrmləri nəzərdən keçirəcəyik. Bizim müzakirəmizin diqqət mərkəzi, hüceyrə membranlarında tapılmış əsas lipidlərin – fosfolipidlərin, sfinqolipidlərin, xolesterinin və onların sələflərinin biosintezi və daşınmasıdır. Lipid biosinteszində suda-həll olan sələflər membranla-əlaqəli intermediatorlarda toplanırlar və sonra da membran lipid məhsullarına çevrilir. Lipidlərin, xüsusən də membran komponentlərinin müxtəlif orqanoidlər arasında hərəkəti, membranların düzgün tərkibinin və xassələrinin, həmçinin ümumi hüceyrə quruluşunun saxlanılması üçün çox əhəmiyyətlidir.

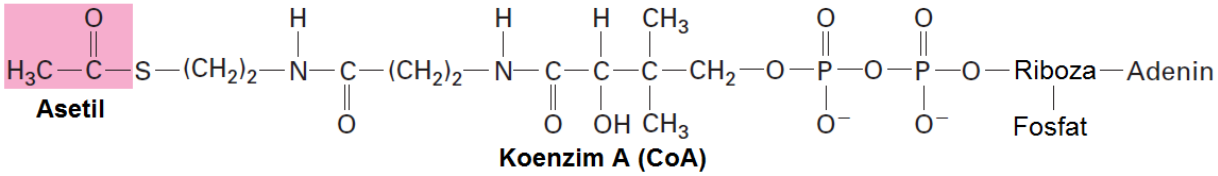
Membran biosintezinin fundamental prinsipi odur ki, hüceyrələr yeni membranı mövcud olan köhnə membranın üzərində genişləndirməklə sintez edirlər. [Bir istisna avtofaqlardır, burada yeni membran, birinci oraqvari avtofaqın formalaşması ilə yaranır, bunun konstruksiyasına fosfatidiletanolaminin ubixitinə-bənzər modifikator Atg8 ilə modifikasiyası daxildir (bax Şəkil 14-35)]. Membran lipidlərinin sintezində bəzi erkən mərhələlər sitoplazmada baş versə də, son mərhələlər əvvəldən mövcud olan hüceyrə membranlarına birləşmiş fermentlərlə kataliz olunurlar və yaranan məhsullar dərhal membranla birləşir. Bu prosesin sübutu hüceyrələr qısa müddətdə radioaktiv nişanlanmış sələflərə (məsələn, fosfatlara və ya yağ turşularına) məruz qoyulduqda görünür: nişanlanmış bu sələf maddələrin inkorporasiya etdiyi bütün fosfolipidlər və sfinqolipidlər hüceyrədaxili membranlara birləşirlər, yağ asil zəncirlərinn hidrofobluğundan gözlənildiyi kimi, heç biri sərbəst şəkldə sitozolda tapılmamışdır.

Membran lipidləri formalaşdıqdan sonra, onlar müvafiq olaraq həm verilmiş membram vərəqələrində həm də eukariot hüceyrələrin fərqli orqanoidlərinin sərbəst membranları arasında eləcə də plazma membranında paylanmalıdır. Burada biz, dəqiq lipid paylanmasının necə həyata keçdiyinə baxırıq; Biz Fəsil 13 və 14-də membran zülallarının hüceyrə membranlarına necə keçirildiyini və hüceyrə daxilində öz müvafiq yerlərinə necə daşındıqlarını müzakirə edirik.

Yağ Turşuları Bir Sıra Əhəmiyyətli Fermentlər Vasitəsilə İki-Karbonlu Quruluş Bloklarından Yığılırlar

Yağ turşuları (bax Fəsil 2) hüceyrədə bir sıra əhəmiyyətli rol oynayır. Hüceyrənin yanacaq (enerji) mənbəyi olmaqlq yanaşı (Fəsil 12-də aerob oksidləşmənin müzakirəsinə bax), yağ turşuları həm fosfolipidlərin həm də sfinqolipidlərin əsas komponentləri olaraq hüceyrə membranını təşkil edirlər, onlar həmçinin bəzi zülalları hüceyrə membranına birləşdirirlər (bax Şəkil 7-19). Beləliklə, yağ turşuları sintezinin tənzimlənməsi bütövlükdə membran sintezinin tənzimlənəsində əsas rolu oynayır. Fosfolipidlərdə olan əsas yağ turşuları 14, 16, 18 və ya 20 karbon atomlarına malikdirlər və bura həm doymuş həm də doymamış zəncirlər daxildirlər. Sfinqolipidlərdə tapılan yağ asil zəncirləri fosfoqliseridlərdə olanlardan uzun ola bilir, 26-ya qədər karbon atomundan təşkil olunrlar və digər kimyəvi dəyişiklikləri də (məsələn hidroksilləşməni) daşıya bilirlər.

Yağ turşuları iki-karbonlu quruluş bloku sirkə turşusundan (CH_3COO^-) sintez olunurlar. Hüceyrələrdə, həm sirkə həm də intermediatorlar yağ turşusu biosintezində suda həll olan böyük molekula, Koenzim A-ya (CoA) efirləşirlər, buna misal kimi **asetil CoA**-nın qurluşu (aşağıda) göstərilir:



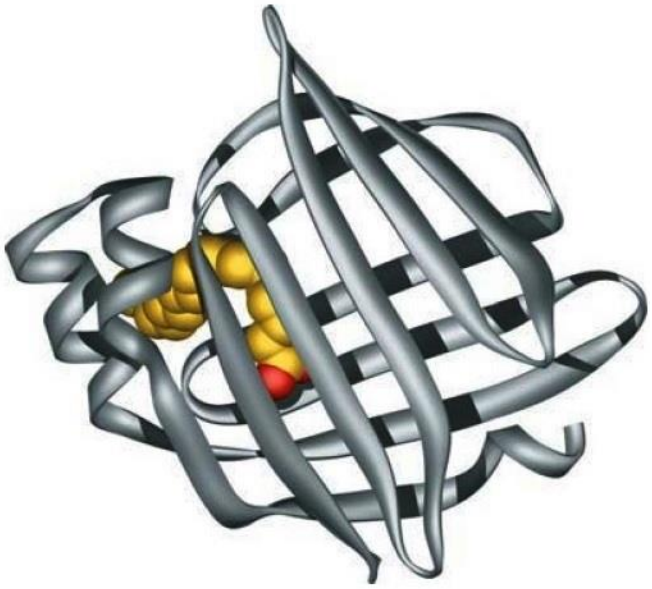
Koenzim A (CoA)

Asetil CoA, Fəsil 12-də ətraflı izah olunduğu kimi, qlükozanın, yağ turşularının və çox amin turşularının metabolizmində əhəmiyyətli intermediatdır. O həmçinin çoxsaylı biosintetik yollarda asetil qruplarını verir. 14 və ya 16 karbon atomuna malik olan **doymyş** (karbon-karbon ikiqat rabitəsi olmayan) yağ turşuları iki ferment – *asetil-CoA karboksilaza* və *yağ asil sintaza* vasitəsi ilə asetil CoA-dan istehsal olunurlar. Bu fermentlər heyvan hüceyrələrində sitozolda tapılmışdır, bitkilədə isə onlar xloroplastlarda tapılmışdır. Palmitoyl CoA (CoA-ya bağlanan 16 karbonlu yağ asil qrupu) endoplazmatik şəbəkədə (ER) və ya bəzən mitoxondridə iki-karbon vahidinin ardıcıl əlavə olunması ilə 18-24 karbona qədər uzana bilir. Desaturaza fermentləri də ER-də yerləşir, bəzi yağ turşularına spesifik mövqelərdə ikiqat rabitəni daxil edərək doymamış yağ turşularını yaradırlar. Məsələn, oleil CoA (oleat CoA ilə birləşir, bax Cədvəl 2-4) stearil CoA-dan iki H atomunun çıxarılması ilə əmələ gəlir. Yağ asil CoA törəmələri sərbəst yağ turşularşnın əksinə, CoA seqmentlərinin hidrofilliyinə görə sulu məhlulda həll olurlar.

Kiçik Sitozol Zülalları Yağ Turşularının Hərəkətinə Şərait Yaradırlar

Sərbəst və ya efirləşməmiş yağ turşuları (bunlar CoA ilə birləşməmişlər) bütün hüceyrə sitoplazmasından keçərək daşınmaq üçün, bir qayda olaraq, *yağ-turşusu-birləşdirən zülallarla* (*fatty-acid-binding proteins* – FABP) birləşirlər, bu zülallar kiçik sitozol zülallar qrupuna aid olub çaperonlar kimi fəaliyyət göstərərək lipidlərin çoxunun hüceyrədaxili köçürülməsinə imkan yaradırlar. Bu zülallar, β vərəqlərin düzülüşündən ibarət olan hidrofob cibə (zonaya) malikdirlər (Şəkil 7-24). Uzun zəncirli yağ turşuları bu cibin daxilinə uyğun gəlir (yerləşirlər) və əhatələrində olan zülalla kovalent əlaqəyə girirlər.

Hüceyrə FABP-larının ekspressiyası hüceyrənin yağ turşularını qəbul etmək və buraxmaq tələbatları ilə koordinasiya olunaraq tənzimlənir. Beləliklə, FABP səviyyəsi ATP istehsal etmək üçün yağ turşularından istifadə etdən fəal əzələlərdə və triqliseridlər kimi saxlamaq üçün yağ turşularını götürən və ya başqa hüceyrələrin istifadəsi üçün yağ turşularını buraxan adipositlərdə (piy saxlayan hüceyrələrdə) daha yüksək olur. Yağ turşusu metabolizmində FABP-ların əhəmiyyəti aparılan müşahidələrlə işıqlandırılmışdır, onlar qara ciyər hüceyrələrində bütün sitozol zülallarının 5 faizə qədər böyük bir hissəsini təşkil edirlər və ürək əzələlərində FABP-ın genetik fəalsızlaşması ürəyi enerji üçün əsas yağ turşularını yandıran əzələdən qlükozanı yandıran əzələyə çevirir.



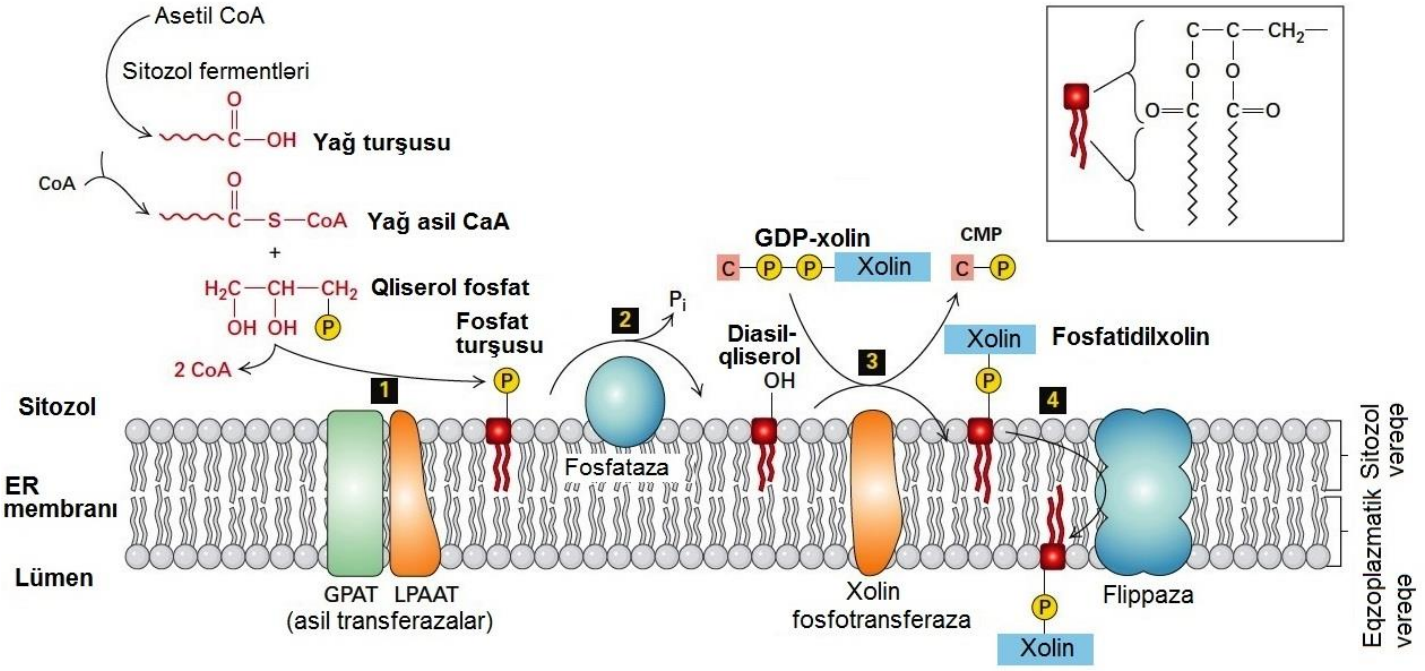
Yağ Turşuları Əsasən ER Membranlarında Fosfolipidlərə Birləşirlər

Yağ turşuları fosfolipidlərə birbaşa birləşmirlər, əksinə, eukariot hüceyrələrdə onlar əvvəlcə CoA efirlərinə çevrilirlər. Sonra heyvan hüceyrələrində fosfolipidlərin, məsələn fosfoqliseridlərin sintezi ER membranında, adətən ER-in hamar sitozol üzünə birləşmiş fermentlərlə aparılır, bir sıra mərhələlərdən keçərək yağ asil CoA-lar, qliseril 3-fosfat və polyar baş qrup sələflər bir-biri ilə bağlanırlar, sonra ER membrana keçirilirlər (Şəkil 7-25). Faktiki olaraq, bu fermentlərin membranın sitozol tərəfində yerləşmələri membran biogenezinin irsən ötürülmüş asimmetriyasını göstərir: yeni membran ilkin olaraq yalnız bir membran vərəqəsində sintez olunur, bu lipidlərin membran vərəqələrində asimmetrik paylanmasının əhəmiyyətli nəticələrinə dair bir faktdır. Fosfolipidlər ER-da sintez olunduqdan sonra başqa orqanoidlərə və plazma membranına daşınırlar. Mitoxondri öz membran lipidlərinin bəzilərini sintez edir, digərlərini isə import edir.

Sfinqolipidlər də həmçinin, dolayı yolla çoxsaylı sələflərdən sintez olunurlar. Bu lipidlərin quruluş blokları olan sfinqozin, palmitoil CoA-dakı palmitoil qrupunun serinə birləşməsi ilə başlayaraq ER-da baş verir, N-asil sfinqozini əmələ gətirmək üçün ikinci yağ asil qrupunun əlavə olunması da ER-də baş verir. Sonra, Qolcidə seramidə polyar baş qrup əlavə olunur və baş qrupu fosforilxolin olan *sfinqomyelini*, baş qrupu müxtəlif monosaxaridlər və ya daha mürəkkəb oliqosaxaridlər olan müxtəlif *qlikosfinqolipidləri* əmələ gətirir (bax Şəkil 7-8b). Bəzi sfinqolipidlərin sintezi mitoxondridə baş verir. Seramid və onun metabolik məhsulları sfinqolipidlərdə özül rolunu oynamaqla yanaşı, hüceyrənin inkişafına, proliferasiyasına, endositoza, stresə davamlılığına və proqramlaşdırılmış hüceyrə ölümünə (apoptoza) təsir edən çox əhəmiyyətli siqnal molekullarıdırlar.

Sfinqolipidlərin sintezi Qolcidə tamamlandıqdan sonra, onlar Fəsil 14-də müzakirə olunan zülalların daşınması mexanizminə oxşar olan qovucuqlar mexanizmi vasitəsi ilə hüceyrənin digər kompartmentinə daşınırlar. Qovucuqlarla daşınmanın istənilən tipi yalnız qovucuğa yüklənmiş zülalların deyil, həmçinin qovucuqları təşkil edən lipidlərin daşınması (hərəkəti) ilə nəticələnir. Bundan başqa, fosfoqliseridlər kimi fosfolipidlər, eləcə də xolesterin orqanoidlər arasında aşağıda təsvir olunmuş əlavə mexanizmlərlə hərəkət edə bilirlər

ŞƏKIL 7-24 Yağ turşularının yağ-turşusu-birləşdirən zülalın (FABP) hidrofob cibinə birləşməsi. Adiposit DABP-ın kristal quruluşu (lent diaqram) aşkar etdi ki, hidrofob birləşmə cibi iki β vərəqdən təşkil olunub, bir-birinə təxminən düz bucaq altındadırlar və qapalı-balıqqulağı quruluşunu əmələ gətirirlər. Yağ turşusu (karbonlar sarı, oksigenlər isə qırmızı) bu cib daxilində olan hidrofob aminturşy qalıqları ilə qeyri kovalent qarşılıqlı əlaqədədir. Bax: A. Reese-Wagonet et al.,1999, *Biochem.Biophys.Acta* **23**:1441(2-3):106-116. [Verilənlər Z. Xu, D. A. Bernlohr, and L. J. Banaszak, 1993, *J. Biol. Chem.* **268**:7874, PDB ID 1lid-dən.]



ŞƏKIL 7-25 ER membranlarında Fosfolipidlərin sintezi. Fosfolipidlər amfipatik molekullar olduğundan onların çoxmərhələli sintezinin sonuncu mərhələsi membranla sitozol arasındakı interfeysdə baş verir və membrana birləşmiş fermentlərlə kataliz olunur. Pillə 1:Yağ asil CoA-dan iki yağ turşusu fosforlaşmış qliserin özülünə efirləşərək fosfatid turşusunu əmələ gətirir, onun iki uzun karbohidrogen zənciri molekulu membrana lövbər edir (bağlayır). Pillə 2: Fosfataza fosfatid turşusunu diasilqliserinə çevirir. Pillə 3: Polyar baş qrup (məsələn, fosforilxolin) sitozin difosfoxolindən (CDP-xolin) açıq qalmış hidroksil qrupuna köçürülür. Pillə 4: Flippaza zülalları fosfolipidlərin ilk sintez olunduqları sitozol vərəqəsindən eqzoplazmatik vərəqəyə köçürülməsini kataliz edirlər.

.

Flippazalar Fosfolipidləri Bir membran Vərəqindən Qarşı Vərəqə Köçürə Bilirlər

Fosfolipidlər ilkin olaraq ER membranın sitozol vərəqəsinə inkorporasiya olunsalar da, müxtəlif fosfolipidlər ER membranın iki vərəqəsində və digər hüceyrə membranlarında asimmetrik paylanırlar. Yuxarıda qeyd olunduğu kimi, fosfolipidlər bir membran vərəqəsindən digərinə asanlıqla şap-şup (flip-flop) etmirlər. ER membranların hər iki vərəqəsini böyütməklə genişlləndirmək üçün və fosfolipidlərin asimmetrik paylanmasına nail olmaq üçün onun fosfolipid komponentləri bir membran vərəqəsindən digərinə keçmək qabliyyətinə malik olmalidir. Hərçənd ki, membran fosfolipidlərinin asimmetrikliyinin yaranması və saxlanılması mexanizmləri yaxşı öyrənilməmişdir, amma o aydındır ki, burada flippazalar əsas rol oynayırlar. Fəsil 11-də təsvir edildiyi kimi, bu inteqral membran zülalları, fosfolipid molekullarının bir membran vərəqəsindən digərinə hərəkətini həyata keçirmək üçün ATP hidrolizinin enerjisindən istifadə edirlər (bax Şəkil 11-16).

Xolesterin Sitozolda və ER Membranında Fermentlərlə Sintz Olunur

İndi biz diqqətimizi heyvan hüceyrələrinin əsas sterolu olan xolesterinə yönəldirik. Xolesterin əsasən qaraciyərdə sintez olunur. Xolesterinin sintezinin ilk pillələri (Şəkil 7-26) – CoA ilə bağlı olan üç asetil qrupunun (asetil CoA), CoA-ya bağlı olan 6-karbonlu β-hidroksil-β-metilqlutaril (HMG-CoA) molekuluna çevrilməsi – sitozolda baş verir. Xolesterin biosintezinin sürətinə–nəzarət edən pillə, HMG-CoA-nın mevalonata çevrilməsi, həm substratın həm də məhsulun suda həll olmasına baxmayaraq ER inteqral membarn zülalı *HMG-CoA reduktaza* ilə kataliz olunur. HMG-CoA reduktazanın suda həll olan katalitik domeni genişlənib sitozola çıxır, amma onun səkgiz transmembran α spiralı fermenti möhkəm şəkildə ER membran daxilinə keçirir. Transmembran α spiralların beşi *sterol-hissetmə-domeni* adlanan domeni əmələ gətirir və fermentin stabilliyni tənzimləyir. ER membranda xolesterinin səviyyəsi yüksək olanda, xolesterinin bu domenə birləşməsi fermentin Insig-1 və Insig-2 adlanan iki başqa inteqral ER membran zülallarına birləşməsinə səsbə olur. Bu birləşmə öz növbəsində, HMG-CoA reduktazanın ubikvitinləşməsini (bax Şəkil 3-31) və proteosom yolu ilə onun parçalanmasını induksiya edir və xolesterin biosintezinin əsas aralıq məhsulu olan mevalonatın istehsalını reduksiya edir.

Çox hallarda xolesterindən-asılı olan arterial laxtalanma adlanan *ateroskleroz*, xolesterinin və başqa lipidlərin, hüceyrələrin və hüceyrəxarici matrisa materialının arteriyanın divarlarının daxili qatlarında proqressiv çökməsi ilə xarakterizə olunur. Nəticədə arteriya divarının baş verən pozulması ya təklikdə ya da qan laxtası ilə birlikdə qan axınının qarşısının alınmasına səbəb olur. Birləşmiş Ştatlarda ürək damar

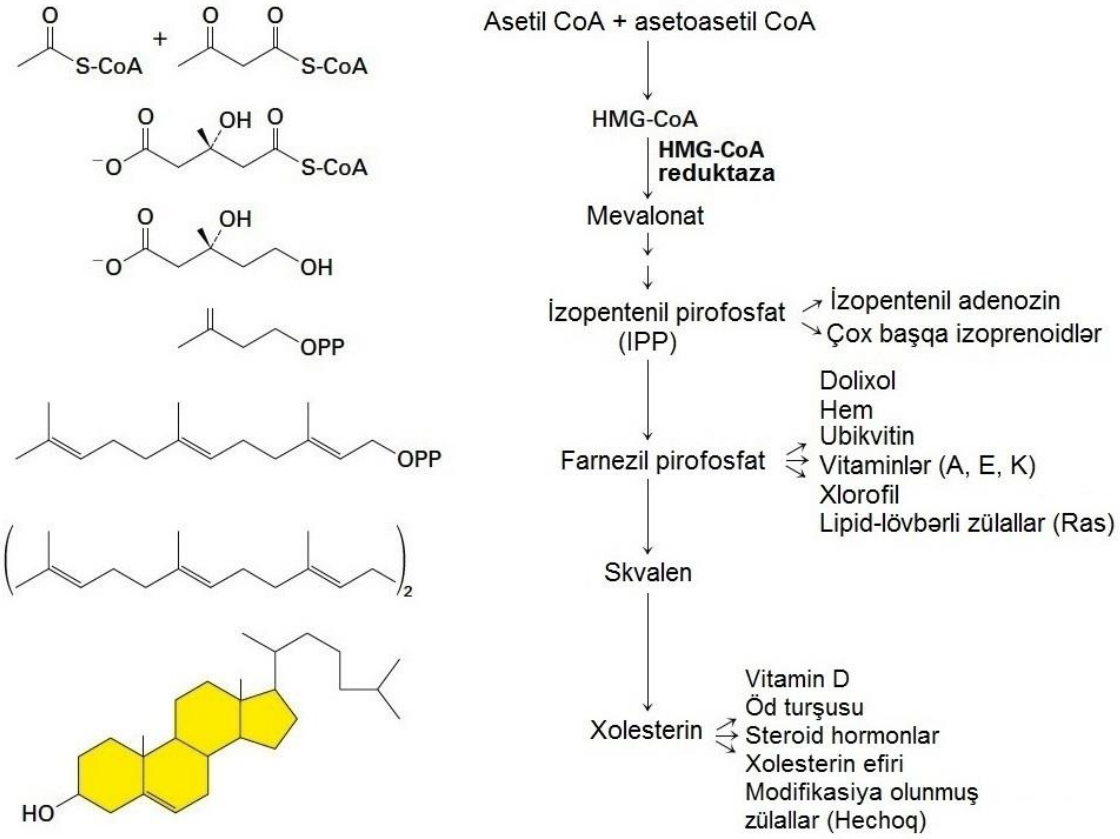
xəstəlikləri üzündən ölüm hallarının 75 faizini ateroskleroz təşkil edir.

Yəqin ki, anti-aterosklerozisə qarşı ən uğurlu müalicə vasitəsi ***statinlər***dir. Bu dərman HMG-CoA reduktazaya birləşərək birbaşa onun fəallığını ingibirləşdirir, bununla da xolesterinin biosintezini azaldır. Nəticə etibarı ilə, aşağı sıxlıqlı lipozülalların (bax Şəkil 14-27) ─ çox hallarda və düzgün olaraq "pis-xolesterin" kimi adlanan, yağ turşularına qədər efirləşmiş xolesterinə malik olan kiçik, membranla örtülmüş zərrəciklərin qatılığı qanda düşərək ateroskleroz plaqın yaranmasını zəiflədir.

HMG-CoA reduktazanın istehsal etdiyi altı-karbonlu məhsul mevalonat bir sıra mərhələlərdən keçərək beş-karbonlu izoprenoid birləşmə olan izopentenil pirofosfata (IPP) və onun stereo-izomeri dimetilallil pirofosfata (DMPP) çevrilir (bax Şəkil 7-26). Bu reaksiyalar, xolesterinin biosintezi yolundakı ardıcıl reaksiyalar kimi, sitozol fermentləri ilə kataliz olunurlar, burada altı IPP vahii sıxlaşaraq, 30-karbonlu şaxələnmiş-zəncirdən ibarət olan aralıq məhsul skvaleni əmələ gətirirlər. ER membranına birləşmiş fermentlər çoxsaylı reaksiyaları kataliz edərək skvaleni məməlilərdə xolesterinə, başqa növlərdə isə digər müvafiq steroidlərə çevirirlər. Bu yolda aralıq məhsullaradn biri, farnezil pirofosfat, Ras və buna yaxın olan zülalların (bax Şəkil 7-19), eləcə də başqa mühüm biomolekulların (bax Şəkil 7-26) plazma membranın sitozol səthinə lövbər edən prenil lipidin sələfidir.

Xolesterin və Fosfolipidlər Orqanoidlər Arasında Bir Sıra Mexanizmlərlə Daşınırlar

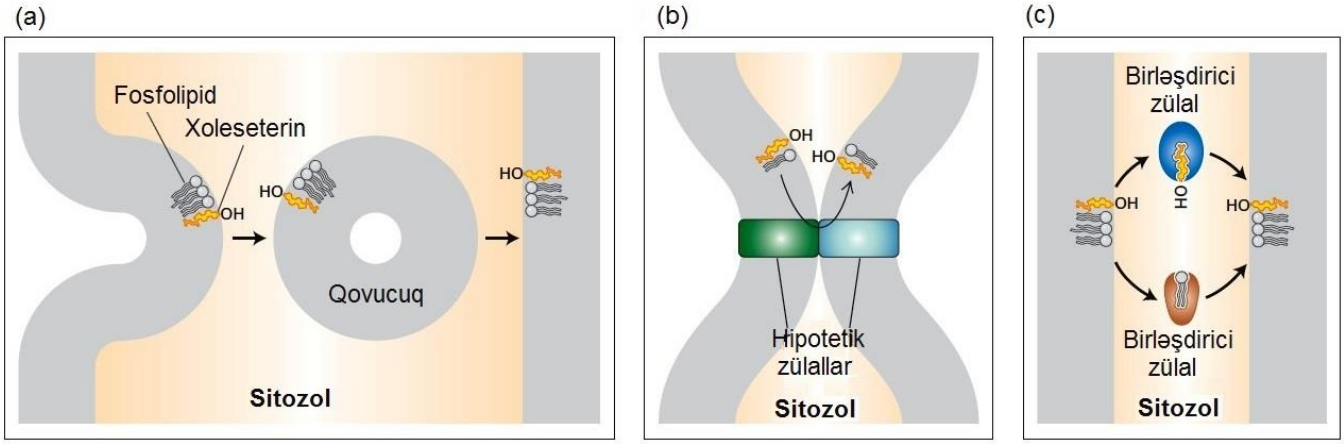
Artıq qeyd olunduğu kimi, xolesterinin və fosfolipidlərin sintezinin son mərhələsi əsasən ER-da baş verir. Beləliklə, plazma membranı və başqa orqanoidləri bağlayan membranlar bu lipidləri bir və ya daha artıq hüceyrədaxili daşınma prosesləri ilə əldə etməlidirlər. Membran lipidləri, Fəsil 14-də müzakirə olunan ifrazat yolları zamanı həll olan zülalları və membran zülallarını müşayət edə bilirlər və edirlər, membran qovucuqları ER-dən tumurcuqlayır və Qolci kompleksi ilə qovuşurlar, başqa membran qovucuqları isə Qolci kompleksindən tumurcuqlayır və plazma membranı ilə qovuşurlar (Şəkil 7-27a). Amma, bir sıra sübutlar göstərir ki, xolesterinin və fosfolipidlərin orqanoidlərarası hərəkəti əhəmiyyətli dərəcədə başqa mexanizmlərlə də baş verir. Məsələn, klassik ifrazat yollarının kimyəvi ingibitorları və qovucuqlarla daşınmaya mane olan mutasiyalar membranlar arasında fosfolipid və xolesterinin daşınmasına mane olmur.



ŞƏKİL 7-26 Xolesterinin biosintez yolu. Xolesterinin biosintezində tənzimlənən sürət-nəzarəti mərhələsi ER membran zülalı HMG-CoA reduktaza vasitəsi ilə β-hidroksil-β-metilqlutaril CoA-nın (HMG-CoA) mevalon turşusuna çevrilməsidir. Sonra, mevalonat beş-karbonlu izoprenoid quruluşlu izopentenil pirofosfata (IPP) çevrilir. IPP, tez-tez hallarda burada göstərilən poliizoprenoid intermediator vasitəsi ilə xolesterinə və digər çoxsaylı başqa lipidlərə çevrilə bilir. İzoprenoid intermediatorlardan törəyən çoxsaylı birləşmələrin bəziləri və xolesterinin özü burada göstərilir.

Lipidlərin daşınmasının ikinci ehtimal olunan mexanizmi, ER və ya ER-dən törənən membranların başqa orqanoidlərin membranları ilə zülalla-vasitələnən birbaşa əlaqəsinin yaradılmasıdır (Şəkil 7-27b). Üçüncü ehtimal olunan mexanizmdə, kiçik lipid-daşıyan zülallar müxtəlif membranlar arasında fosfolipidlərin və ya xolesterinin mübadiləsinə imkan yaradırlar (Şəkil 7-27c). Bu cürə lipid-daşıyan zülalların in vitro sınaqlarda identifikasiya olunmasına baxmayaraq, fosfolipidlərin əksəriyyətinin hüceyrədaxili hərəkətlərində onların rolu kifayət qədər müəyyən olunmamışdır. Məsələn, fosfatidilxolin-daşıyan zülalı kodlaşdıran geni nokaut mutasiya olunmuş siçan əksər aspektlərindən normal görünmüşdür, bu göstərir ki, bu zülal hüceyrənin fosfolipid metabolizmi üçün vacib deyildir.

Əvəllər qeyd olunduğu kimi, müxtəlif orqanoid membranlarının lipid tərkibi xeyli dərəcədə fərqlənir (bax Cədvəl 7-1). Bu fərqlərdən bəziləri sintezin müxtəlif mərkəzlərdə baş verməsinə görədir. Məsələn, mitoxondri membranında yerləşən kardiolipin adlanan fosfolipid, yalnız mitoxondridə yaranır və çox az miqdarda başqa orqanoidlərə ötürülür. Lipidlərin differensial daşınması da həmçinin, müxtəlif hüceyrə membranlarında lipid tərkibinin müəyyən olunmasında rol oynayır. Məsələn, baxmayaraq ki, xolesterin ER-də yaranır, xolesterinin qatılığı (xolesterinin-fosfolipidlərlə molyar nisbəti) başqa orqanoidlərə (ER, Qolci, mitoxondri, lizosom) nisbətən plazma membranda ~1.5-13 dəfəyə qədər yüksək olur. Bu fərqlərin yaranması və saxlanılması mexanizmləri tam başa düşülməmişdir, amma biz gördük ki, hər bir membranın fərqli lipid tərkibi onun fiziki və bioloji xassələri üzərində böyük təsirə malikdir.



ŞƏKİL 7-27 Membranlar arasında xolesterinin və fosfolipidlərin daşınmasının təklif olunan mexanizmi. (a) mexanizmində membranlar arasında lipidləri qovucuqlar keçirir. (b) mexanizmində lipid keçirilməsi membrana-batmış zülallarla həyata keçiilən membranlar arasındakı birbaşa əlaqənin (təmasın) nəticəsində baş verrir. (c) mexanizmində keçirilmə həll olan kiçik lipid-ötürən zülallar vasitəsilə baş verir. Bax F.R. Maxfield and D.Wustner, 2002, *J.Clin.Invest.* **110**:891.]

7.3 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Fosfolipidlər, Sfinqolipidlər və Xolesterin: Sintezi və Hüceyrə Daxili Hərəkətləri

- Müxtəlif uzunluqda zəncirlərə malik olan doymuş və doymamış yağ turşuları fosfolipid və sfinqolipidlərin komponentləridir.
- Yağ turşuları suda həll olan fermentlər vasitəsi ilə asetil CoA-dan sintez olunurlar və endoplazmatik şəbəkədə (ER) elonqasiya və desaturasiya (doymamış) edilməklə modifikasiya olunurlar.
- Sərbəst yağ turşuları hüceyrə daxilində yağ-turşusu-birləşdirən zülallar (FABP) vasitəsi ilə daşınırlar.
- Yağ turşuları çoxmərhələli proseslə fosfolipidlərə daxil olurlar. Fosfoqliseridlərin və sfinqolipidlərin sintezinin son pillələri əsasən ER-in sitozol üzündə membrana birləşmiş fermentlərlə kataliz olunurlar (bax Şəkil 7-25).
- Yeni sintez olunmuş lipidlərin hər bir tipi onun sintz olunduğu artıq mövcud olan membranlara birləşir, beləliklə, membranlar özlüyündə yeni membran materiallarının sintezi üçün platformadır.
- Membran fosfolipidlərinin əksəriyyəti daha böyük üstünlüklə membranın ya eqzoplazmatik ya da sitozol vərəqəsində paylanırlar. Bu asimmetriya, fosfolipidləri bir membran vərəqəsindən digərinə keçirən flippazaların fəaliyyətinin nəticəsidir.
- Xolesterinin biosintezində ilkin pillələr sitozolda baş verdiyi halda, sonuncu pillələr ER membranına birləşmiş fermentlər vasitəsi ilə kataliz olunurlar.
- Xolesterinin biosintezində sürətə-nəzarət edən pillə, transmembran seqmentləri ER membranına batmış və sterolu-hiss edən domenə malik olan HMG-CoA reduktaza vasitəsi ilə kataliz olunur.
- Kifayət qədər dəlillər sübut edir ki, qovucuqlarla daşınma, müxtəlif membranlar arasında zülalla-vasitələnən birbaşa əlaqələr, həll-olan lipid-daşıyıcı zülallar və ya bunların hər üçü xolesterinin və fosfolipidlərin bəzi orqanoidlər-arası daşınasında iştirak edə bilərlər (bax Şəkil 7-27).

Açar sözlər

akvaporin
amfipatik
ateroskleroz
doymamış
doymuş
eqzoplazmztik üz
flippaza
fosfoqliserid
fosfolipaza
fosfolipid ikiqatlısı
hidrofil
hidrofob
xolesterin
inteqral membran zülalı
kirpicik
qamçı
qlikolipid
qlikozülal
lektin
lipid damlaları
lipid sal
lipiddə lövbər salan membarn zülalı
liposom
lümen
membran transport zülalı
miselli
periferial membran zülalı
plazma membranı
porin
reseptor zülalı
sfinqolipid
sitoskelet
sitozol üzü
statin
sterol

Konsepsiyalara Baxış

1. Elektron mikroskopu ilə baxanda, lipid ikiqatlısının dəmir yolu izi kimi göründüyü təsvir olunur. İkiqatlının quruluşunun bu görünüşü necə yaratdığının izah edin.
2. Aşağıdkı tərtibatı izah edin: Bütün biomembranların quruluşu fosfolipidlərin kimyəvi xassələrindən asılıdır, halbuki hər bir spesifik biomembranın funksiyası bu membranla birləşmiş spesifik zülallardan asılıdır.
3. Biomembranlar müxtəlif tipli çoxsaylı lipid molekullarına malikdirlər. Biomembranlarda hansı üç əsas tip lipid molekulları tapılmışdır? Bu üç tip necə oxşardırlar və necə fərqlənirlər?
4. Lipid ikiqatlıları iki-ölçülü mayelər kimi hesab edilirlər. Bu nəyi bildirir? İkiqatlı daxilində lipid molekullarının və zülalların hərəkətini həyata keçirən nədir? Bu cürə hərəkətlər necə ölçülə bilər? Membranların mayelilik dərəcəsinə təsir edən faktorlar hansılardır?
5. Nəyə görə suda-həll olan maddələr hüceyrə membranında lipid ikiqatlısını asanlıqla kəsib keçə bilmir? Hüceyrələr belə nüfuzetmə səddinə (baryerinə) necə nail olurlar?
6. Membranla-birləşmiş zülalların hansı üç qrupa daxil olduqlarını adlandırın. Bu üç qrupun hər birinin membranla assosasiya etmə mexanizmini izah edin.
7. Aşağidaki membranala-assossayia edən zülalları onların quruluşlarına görə identifikasiya edin: (a) hər biri altı membrana-sarınan α spirala malik olan identik subvahidlərin tetramerləri; (b) hər biri 16 β vərəqlərin yaratdığı çəlləyə-bənzər quruluşda olan identik subvahidlərin trimerləri.
8. Zülallar lipidlərə kovalent birləşməklə plazma membranın eqzoplazmatik və ya sitozol üzünə birləşə bilirlər. Hansı üç tip lipid lövbəri zülalların plazma membranın vərəqələrinə bağlanmasını həyata keçirir? Xarici mühitə baxan hüceyrə-səth zülalları tərəfindən hansı tip istifadə olunur? Qlikozilləşmiş proteoqlikan zülalları tərəfindən hansı tip istifadə olunur?
9. Hərçənd ki, biomembranların hər iki üzü makromolekulların eyni əsas tiplərindən – əsasən lipidlər və zülallardan təşkil olunublar, ikiqatlının iki üzü identik deyildir. İki üz arasındakı asimmetriyanı nə izah edir?
10. Detergentlər nədir? İonlaşan və ionlaşmayan detergentlər, hüceyrə membranının quruluşunu dağıtmaq qabliyyətinə görə necə fərqlənirlər?
11. Membranla-assosasiya edən zülalların ehtimal olunan identikliyi nədir: (a) yüksək duz qatılığı ilə membrandan azad olmaq ion əlaqələrinin pozulmasına səbəb olur; (b) yalnız yüksək-duz qatılığına məruz qoymaqla membrandan ayrılmırılar, amma fosfat-qliserin əlaqələrini kəsən və kovalent əlaqələri qıran fermentlərlə inkubasiya edən zaman buraxılırlar; (c) yüksək-duz qatılığı məhluluna məruz qoyma zamanı membrandan ayrılmayan zülallar natrium dodesil sulfat (SDS) detergenti əlavə edildikdən sonra azad olurlar. (c) hissəsində ayrılan zülalın fəallığı ayrıldıqdan sonra saxlanılacaqmı?
12. İonlaşmayan detergent Triton X-100-dən istifadə etməklə membran ekstraktının məhsullarını alırsınız, siz mass spektrometriya vasitəsi ilə membran lizatlarını analiz edirsiniz və xolesterinin və sfibnqolipidlərin yüksək miqdarını müşahidə esirsiz. Daha sonra, lizatların biokimyəvi analizləri potensial kinaza fəallığını aşkar edir. Sz böyük ehtimalla nəyi ayırmısız?
13. Endoplazmatik şəbəkə (ER) ilə sitozol arasındakı interfeysdə fosfolipid biosintezində bir sıra problemlər mövcuddur, bu hüceyrə tərəfindən həll olunmalıdır. Aşağıdakıların hər birinin necə həll olunduğunu izah edin:
    (a) Fosfolipid biosintezi üçün substratların hamısı suda həll olandırlar, hərçənd ki, son məhsul həll olan deyil.
    (b) Yeni sintez olunmuş bütün fosfolipidlərin bilavasitə birləşmə mərkəzi ER membranın sitozol vərəqəsidir, hərçənd ki, fosfolipidlər hər iki vərəqəyə inkorporasiya olunmalıdırlar.
    (c) Hüceyrədə çox membran sistemləri, məsələn plazma membranı, öz fosfolipidlərini sintez etmək qabliyyətinə malik deyillər, hərçənd ki, hüceyrə inkişaf edib bölünərkən bu membranlar da böyüyüb artmalidirlar.
14. Fosfolipidlərdə çox rast gəlinən yağ turçusu zəncirləri hansılardır və nəyə görə bu yağ turşusu zəncirləi karbon atomları sayının 2 ədəd artması ilə fərqlənirlər?

15. Yağ turşuları hüceyrə daxilində hərəkət etmək üçün lipid çaperonlarla birləşməlidirlər. Bu çaperonlar nəyə görə lazımdırlar, yağ turçulaerının bu hüceyrədaxili molekulyar daşınmalarını həyata keçirən zülallar qrupuna verilmiş ad nədir? Yağ turşularının hüceyrə daxilində hərəkətinə imkan yaradan bu zülalların əsas fərqləndirici xüsusiyyəti nədən ibarətdir?
16. Xolesterinin biosintezi yüksək dərəcədə tənzimlənən prosesdir. Xolesterinin biosintezinin əas tənzimlənən fermenti hansıdır? Bu ferment geriyə ingibirləşməyə məruz qalır. Geriyə ingibirləşmə nə deməkdir? Bu ferment xolesterinin səviyyəsini hüceyrədə necə hiss edir?
17. Fosfolipidlər və xolesterin hüceyrə daxilində sintez olunduqları mərkəzdən müxtəlif membran sistemlərinə daşınmalıdırlar. Bunu etməyin bir yolu, ifrazat yolunda çoxsaylı zülallar üçün olduğu kimi (Fəsil 14), qovucuqlarla daşınmadır. Lakin, hüceyrələrdə fosfolipid və xolesterinin membrandan-membrana daşınması qovucuqlarla daşınma ilə həyata keçirilmir. Bu hadisənin əsas sübutu nədir? Fosfolipid və xolesterin daşınmasının əsas mexanizmləri nədən ibarətdir?
18. Statinin pis xolesterinin səviyyəsini aşağı salma mexanizmini izah edin.

İstinadlar

Lipid İkiqatlısı: Tərkibi və Quruluşunun Təşkili

McMahon, H., and J. L. Gallop. 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling. *Nature* **438**:590–596.

Mukherjee, S., and F. R. Maxfield. 2004. Membrane domains. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**:839–866.

Ploegh, H. 2007. A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* **448**:435–438.

Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**:31–41.

Simons, K., and W. L. C. Vaz. 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33**:269–295.

Tamm, L. K., V. K. Kiessling, and M. L. Wagner. 2001. Membrane dynamics. *Encyclopedia of Life Sciences.* Nature Publishing Group.

Vance, D. E., and J. E. Vance. 2002. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*, 4th ed. Elsevier.

Van Meer, G. 2006. Cellular lipidomics. *EMBO J.* **24**:3159–3165.

Yeager, P. L. 2001. Lipids. *Encyclopedia of Life Sciences.* Nature Publishing Group.

Zimmerberg, J., and M. M. Kozlov. 2006. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:9–19.

Membran Zülalları: Quruluşu və əsas funksiyaları

Bowie, J. 2005. Solving the membrane protein folding problem. *ature* **438**:581–589.

Cullen, P. J., G. E. Cozier, G. Banting, and H. Mellor. 2001. Modular phosphoinositide-binding domains: their role in signaling and membrane trafficking. *Curr. Biol.* **11**:R882–R893.

Engelman, D. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438**:578–580.

Lanyi, J. K., and H. Luecke. 2001. Bacteriorhodopsin. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**:415–519.

Lee, A. G. 2005. A greasy grip. *Nature* **438**:569–570.

MacKenzie, K. R., J. H. Prestegard, and D. M. Engelman. 1997. A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science* **276**:131–133.

McIntosh, T. J., and S. A. Simon. 2006. Roles of bilayer material properties in function and distribution of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*. **35**:177–198.

Schulz, G. E. 2000. β-Barrel membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**:443–447.

Wucherpfennig, K. W., et al. 2010. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**:a005140.

Fosfolipidlər, Sfinqolipidlər və Xolesterin: Sintezi və Hüceyrədaxili Hərəkət

Bloch, K. 1965. The biological synthesis of cholesterol. *Science* **150**:19–28.

Daleke, D. L., and J. V. Lyles. 2000. Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**:108–127.

Futerman, A., and H. Riezman. 2005. The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* **15**:312–318.

Hajri, T., and N. A. Abumrad. 2002. Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu. Rev. Nutr.* **22**:383–415.

Henneberry, A. L., M. M. Wright, and C. R. McMaster. 2002. The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of fatty acid and lipid head group specificity. *Mol. Biol. Cell* **13**:3148–3161.

Holthuis, J. C. M., and T. P. Levine. 2005. Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**:209–220.

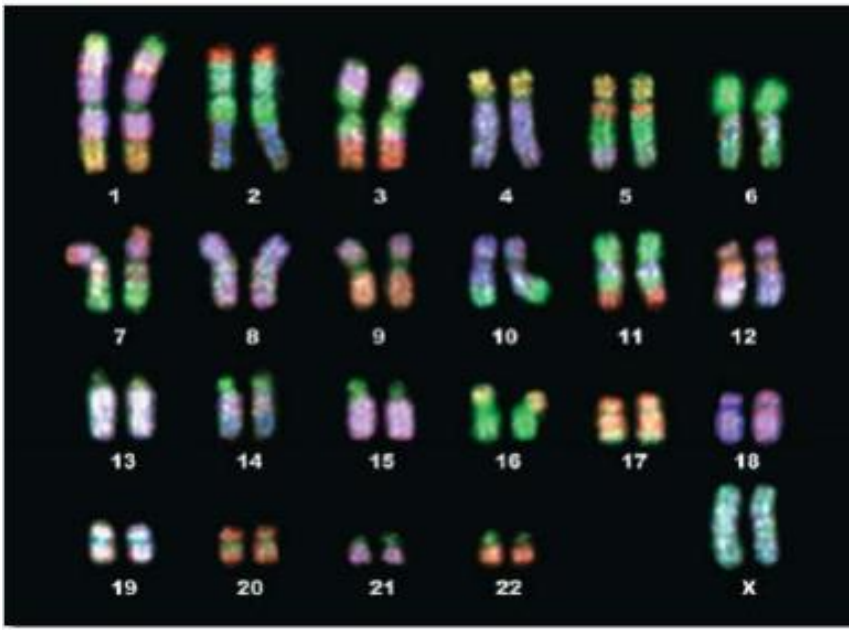
Ioannou, Y. A. 2001. Multidrug permeases and subcellular cholesterol transport. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:657–668.

Kent, C. 1995. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **64**:315–343.

Maxfield, F. R., and I. Tabas. 2005. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* **438**:612–621.

Stahl, A., et al. 2001. Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends Endocrin. Met.* **12**(6):266–273.

van Meer, G., and H. Sprong. 2004. Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**:373–378.



Bu parlaq rəngli FİSH-boyanmış xromosomlar gözəl olmaqla bərabər xromosomların anomaliyasının aşkar olunmasında və müxtəlif növlərin kariotiplərinin müqayisəs etmək üçün faydalıdır [L. Willatt/Science Source.]

FƏSİL

8

Genlər, Genomlar və Xromosomlar

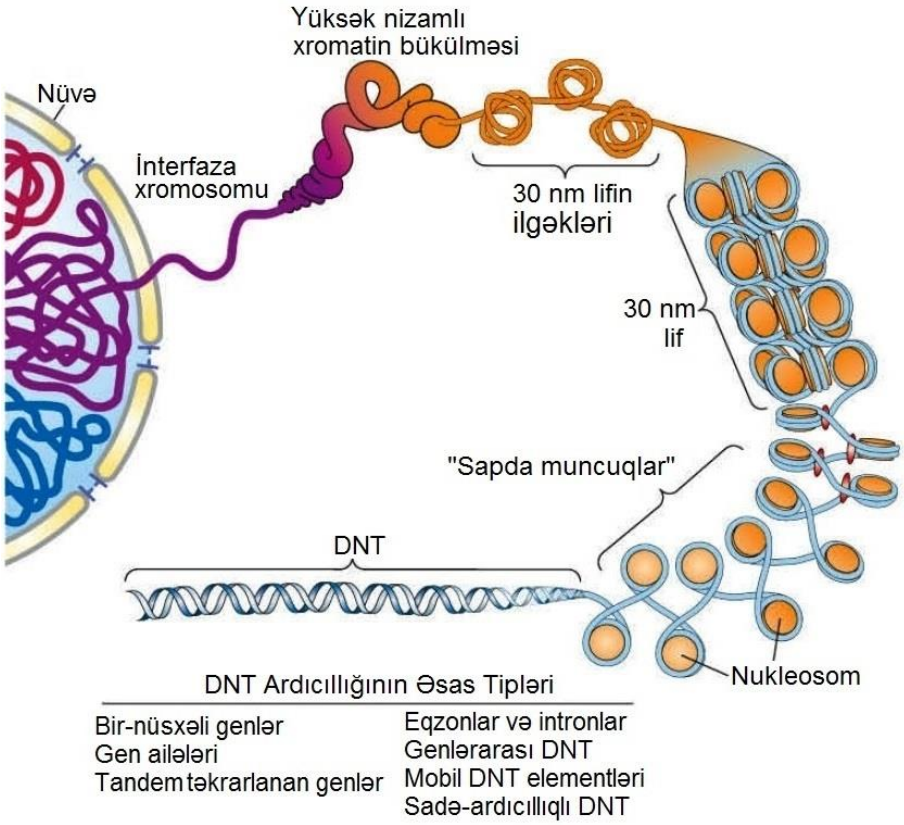
Əvvəlki fəsillərdə biz zülalların quruluşunun və tərkibinin onlara geniş çeşiddə müxtəlif hüceyrə funksiyalarını necə yerinə yetirməsinə imkan verdiyini öyrəndik. Biz həmçinin hüceyrənin həyati əhəmiyyətə malik olan başqa komponentini, nuklein turşularını və DNT ardıcıllığında kodlaşdırılan informasiyanın zülala translyasiyasını həyata keçirən prosesi öyrəndik. Bu fəsildə, eukariotik nüvə genomunun xüsusiyyətlərini nəzərdən keçirməklə bizim diqqətimiz yenə də DNT və zülallar üzərində: genomu təşkil edən başqa genlərin və başqa DNT ardıcıllıqlarının xüsusiyyətləri və hüceyrə daxilində zülallar vasitəsi ilə bu DNT-nin necə qurulması və təşkil olunması üzərində olacaq.

İyirmi birinci əsrin başlanğıcına qədər molekulyar bioloqlar yüzlərlə virusun, onlarla bakteriyanın və bir birhüceyrəli eukariotun, tumurcuqlayan maya göbələyi *S. cerevisiae*-nin tam genomunun oxunmasını başa çatdırdılar. İndiyə qədər genom ardıcıllıqlarının böyük əksəriyyəti bölünən maya göbələkləri, sadə bitki *A. taliana*, düyü və çoxsaylı müxtəlif çoxhüceyrəli heyvanlar (**metazoanlar**), o cümlədən həlqəvi qurd *C. eleganas*, meyvə milçəyi *D. melanogaster*, siçan, insan və ~35 metazoan phyla-dan hər birinin ən azı bir nümayəndəsi üçün məlum olmuşdur. Bu ardıcıllıqlar üzrə verilənlərin dəqiq analizi təkamül prosesində, genomun təşkilində və genlərin funksiyasında yeni baxışları və ideyaları aşkar etdi. O tədqiqatçılara əvvəllər məlum olmayan genləri aşkar etməyə və hər bir genomda zülal kodlaşdıran genlərin ümumi sayını hesablamağa imkan verdi. O həmçinin tədqiqatçılara əvvəllər məlum olmayan genləri identifikasiya etməyə, hər bir genomda zülal kodlaşdıran genlərin ümumi sayını hesablamağa imkan verdi. Gen ardıcıllıqları arasında aparılan müqayisələr çox hallarda yeni aşkar olunmuş genlərin mümkün olan funksiyaları barədə fikir irəli sürməyə imkan verir. Növlər arasında genom ardıcıllığının müqayisəsi və təşkili də həmçinin orqanizmlərin təkamülünü başa düşməyə kömək edir.

Maraqlıdır ki, DNT ardıcıllığının oxunması aşkar etdi ki, ali eukariotların genomunun böyük hissəsi mRNT və ya orqanizm üçün tələb olunan başqa RNT-ləri kodlaşdırmır. Qeyd edək ki, bu cür kodlaşdırmayan DNT insanın xromosom DNT-sinin təxminən ~98.5% təşkil edir! Çoxhüceyrəli orqanizmlərdə kodlaşdırmayan DNT bir-birinə çox oxşayan, amma tamamilə eyni (identik) olmayan rayonlara malikdir. Təkrarlanan DNT ardıcıllıqları daxilində variasiyalar fərdlər arasında o qədər böyük olur ki, hər bir fərd bu variasiyalara əsaslanan DNT "finqerprint" yolu ilə fərqləndirilə bilər. Bundan əlavə, bəzi təkrarlanan DNT ardıcıllıqları eyni növün müxtəlif fərdlərində genomda eyni mövqedə tapılmır. Bir zamanlar bütün kodlaşdırmayan DNT-lər "tullantı DNT-lər" ("junk DNA") kimi adlandırılırdı və hesab olunurdu ki, genomda onların heç bir xidməti yoxdur. Biz indi bütün bu əlavə (ekstra) DNT-lərin və fərdlər arasında müəyyən ardıcıllıqların yerləşməsindəki variasiyaların təkamüldə rolunu başa düşürük. Hüceyrə genomu **transpozon (mobil) DNT elementlərini** toplayaraq saxlayır və onlar özlərinin surətini çıxararaq genom boyu hərəkət edərək yerlərini dəyişə bilirlər. Görünür transpozon DNT elementləri hər bir fərdi orqanizmin həyat tsiklində çox az funksiyaya malik olsa da, onlar təkamül prosesində bizim genomumuzu formalaşdırmış və çoxhüceyrəli orqanizmlərin sürətli təkamülündə böyük rol oynamışdır. Bundan başqa biz indi başa düşdük ki, zülalı və ya stabil RNT-ni kodlaşdırmayan DNT-nin əksər hissəsi gen transkripsiyasının tənzimlənməsində zülal kompleksləri üçün birləşmə saytı rolunu oynayır.

QISA ICMAL

8.1 Eukariotik Genin Quruluşu
8.2 Genlərin və Kodlaşdırılmayan DNT-nin Xromosomda Təşkili
8.3 Transpozon (Mobil) DNT Elementləri
8.4 Genomiks: Genlərin Quruluşunun və Ekspressiyasının Geniş-Genom Analizi
8.5 Eukariot Xromosomlarının Quruluşunun Təşkili
8.6 Eukariot Xromosomlarının Morfologiyası və Funksional Elementləri



ŞƏKIL 8-1 Xromosomların və genlərin quruluşunun ümumi icmalı. Ali eukariotların DNT-si unikal və təkrarlanan ardıcıllıqlardan təşkil olunmuşdur. İnsan genomunun yalnız ~1.5 faizi zülal və funksional RNT-ləri kodlaşdıran və onların expressiyası zamanı tənzimləyici ardıcıllıqlarını təşkil edir, qalanlar genlər arasındakı boş sahə (spacer) DNT-si və genlər daxilində olan intronlardır. Bu DNT-lərin çoxu, insanda təxminən ~45 faizi mobil DNT elementlərindən, müasir genomun təkamülünə kömək edən genetik simbiotlardan ibarətdir. Hər bir xromosom histon və qeyri-histon zülallarla yüksək dərəcədə kondensasiya olunmuş, mürəkkəb şəkildə bükülmüş uzun, insanda təxminən ~280 million əsas cütü ölçüsündə olan vahid bir nuklein turşusundan ibarətdir. Hər bir xromosom nüvədə öz "ərazisində" yerləşir.

Hüceyrə DNT-sinin tam uzunluğu hüceyrələrin mübarizə etməli olduğu əhəmiyyətli bir problemdir. İnsanın tək bir hüceyrəsindəki DNT-nin uzunluğu təxminən 2 metrə qədər çatır, o diametri təxminən 10 μm-dən az olan, sıxlaşma dərəcəsi 10^5:1 nisbətindən çox olan hüceyrə nüvəsi daxilində yerləşməlidir. Başqa sözlə, əgər hüceyrənin diametri 1 santimetr (təxminən bir noxudun ölçüsündə) olsaydı, o zaman onun nüvəsində bükülərək yığılmış DNT-nin ümumi uzunluğu təxminən 2 kilometrə (1.2 mil) yaxın olardı. Nüvə DNT-si ilə əlaqədə olan xüsusi eukariot zülalları DNT-ni zərif şəkildə bükərək onu elə təşkil edir ki, hüceyrə nüvəsində yerləşsin. Bununla yanaşı, eyni zamanda yüksək dərəcədə sıxılmış bu DNT-nin istənilən hissəsi transkripsiya, DNT replikasiyası və DNT zədələnmələrinin reparasiyası üçün bükülmüş DNT-ni dolaşdırmadan və ya qırmadan asanlıqla əlçatan olmalıdır. Bundan əlavə, hüceyrə bölünməsi zamanı onun iki qız hüceyrəyə ayrılmasının gedişində DNT-nin bütövlüyü proses ərzində təmin olunmalıdır. Eukariotlarda DNT-nin və onu təşkil edən zülalların **xromatin** adlanan kompleksi mitozun gedişi zamanı fərdi **xromosomlar** kimi vizuallaşdırıla bilir. Bu və növbəti fəsildə bizim görəcəyimiz kimi, DNT-nin xromatində təşkili genlərin ekspressiyasının bakteriyalarda mümkün olmayan tənzimlənməsinə imkan verir.

Bu fəsilin birinci dörd bölməsində eukariot genlərinin və genomunun mənzərəsinin ümumi icmalını verəcəyik. Birincisi biz eukariot genlərinin quruluşunu və onların ali oraqnizmlərdə mRNT-sələfinin alternativ splaysinq yolu ilə mRNT-lərə çevrilməsindən meydana çıxan mürəkkəbliyini müzakirə edəcəyik. Sonra, biz eukariotlarda DNT-nin əsas siniflərini, o cümlədən transpozon DNT elementlərinin xüsusi xassələrini, onların müasir genomu necə fomalaşdırdığını müzakirə edəcəyik. Belə bir fon bizi **genomiksin**, böyük miqdarda sekvens verilənlərinin analizi və interpretasiyası üçün kompüterə əsaslanan metodlarlala müzakirəsinə hazırlayır. Bu fəsilin sonuncu iki bölməsi eukariot hüceyrələrində DNT-nin fiziki olaraq necə təşkil olunduğuna həsr olunub. Biz DNT-nin və histon zülallarının nukleosomlar adlandırılan yığcam kompleksdə bükülməsinə baxırıq. Bunlar xromatinin qurulduğu fundamental bloklar, xromosomun duplikasiyasının və seqreqasiyasının tələb etdiyi, xromosomların böyük miqyaslı quruluşu və funksional elementləridirlər. Şəkil 8-1 bu predmetlərin ümumi icmalını təqdim edir. Bu fəsildə genlər,

genom və xromosomlar barədə qazanılmış biliklər bizi növbəti iki fəsildə hər bir zülalın və funksional RNT-nin sintezinin və qatılıqlarının hüceyrədə necə tənzimlənməsinin həyata keçirilməsi barədə mövcud bilikləri araşdırmağa hazırlayır.

8.1 Eukariot Genin Quruluşu

Molekulyar mənada ***gen,*** adətən *funksional gen məhsulunun (polipeptid və ya RNT) sintezi üçün lazım olan tam nuklein turşusu ardıcıllığı* kimi ifadə olunur. Bu təyinata görə gen məhfumuna *kodlaşdırıcı rayon* adlandırılan amin turşusu ardıcıllığını və ya funksional RNT ardıcıllığını kodlaşdıran DNT ardıcıllığından daha artıq nukleotid ardıcıllığı daxildir. Genə kodlaşdırıcı rayonla münasibətdə harada yerləşməsindən asılı olmayaraq xüsusi RNT transkriptlərini sintez etmək üçün tələb olunan DNT ardıcıllığı da daxildir. Məsələn, eukariot genlərində **enhanserlər** kimi məlum olan transkripsiya-nəzarət rayonları kodlaşdırıcı rayondan 50 min əsas cütü kənarda yerləşə bilir. Bizim Fəsil 5-də öyrəndiyimiz kimi, eukariot genlərinə daxil olan başqa vacib kodlaşdırmayan rayonlara promotorla yanaşı, *poli (A) saytları* kimi mlum olan 3′ doğranma və poliadenilləşmə ardıcıllıqları və ilkin RNT transkriptlərinin *splays saytları* kimi məlum olan splaysinqi daxildirlər (bax Şəkil 5-15). Transkripsiyanın inisiasiyasına və RNT prosessinqinə nəzarət edən bu ardıcıllıqların mutasiyası RNT-lərin normal ekspressiyasına və funksiyasına təsir edir və mutant orqanizmdə fərqli fenotipin yaransmasına səbəb olurlar. Biz genlərin bu cürə müxtəlif nəzarət elementlərini Fəsil 9 və 10-da ətraflı öyrənirik.

Hərçənd ki, genlərin çoxu zülal kodlaşdıran mRNT-lərə transkripsiya olunurlar, bəzi DNT ardıcıllıqları isə zülal kodlaşdırmayan RNT-lərə transkripsiya olunurlar [məsələn, Fəsil 5-də təsvir olunmuş tRNT-lər və rRNT-lər, Fəsil 10-da təsvir olunan mRNT-nin translyasiyasını və stabilliyini təmin edən miRNT-lər və siRNT-lər, Fəsil 9-da müzakirə olunan, transkripsiyanı tənzimləyən uzun kodlaşdırmayan RNT-lər (lncRNT-lər)]. tRNT-ləri, rRNT-ləri, miRNT-ləri və siRNT-ləri kodlaşdıran DNT ardıcıllığı mutasiya olunanda fərqli fenotipin yaranmasına səbəb olduğundan bu DNT rayonları, hətta son məhsulları zülal yox, RNT-lər olsa da belə, tRNT, rRNT, miRNT və siRNT *genləri* hesab olunurlar.

Bu bölmədə, biz bakteriyalarda və eukariotlarda genlərin quruluşunu öyrənəcəyik və onların müvafiq gen quruluşlarının genin ekspressiyasına və təkamülinə necə təsir etdiyini müzakirə edəcəyik.

Eukariot Genlərin Əksəriyyəti İntronlara Malik Olurlar və Bir Zülalı Kodlaşdıran mRNT-ləri Yaradırlar

Fəsil 5-də müzakirə olunduğu kimi, çox bakterial mRNT-lərə (məsələn: ***trp*** operonla kodlaşdırılan mRNT), bioloji proseslərdə birlikdə fəaliyyət göstərən bir neçə zülalı kodlaşdıran rayon daxildir. Belə mRNT-lər ***polisistron*** mRNT-lər adlandırılır (sistron – "cistron" - bir polipeptidi kodlaşdıran genetik vahiddir). Əksinə, eukariot mRNT-lərin əksəriyyəti ***monosistron***durlar; belə ki, hər bir mRNT molekulu bir zülalı kodlaşdırır. Polisistron və monosistron mRNT-lər arasındakı bu fərq onların translyasiyasındakı fundamental fərqlə korrelyasiya edir.

Bakterial polisistron mRNT daxilində ribosom birləşmə saytı hər bir zülal kodlaşdıran rayonun start saytı və ya mRNT-də sistronlar yaxınlığında yerləşir. Translyasiyanın inisiasiyası bu çoxsaylı daxili saytların istənilən hər hansı birində başlaya və çoxsaylı zülalları yarada bilirlər (bax Şəkil 5-13a). Amma, eukatriot mRNT-lərin çoxunda 5' papağın quruluşu ribosom birləşməsini istiqamətləndirir və translyasiya ən yaxında olan AUG start kodonundan başlaya bilir (bax Şəkil 5-13b). Nəticədə translyasiya yalnız bu saytdan başlayır. Çox hallarda, eukariotların zülal kodlaşdıran genlərinin ilkin transkriptləri prosessinqdə translyasiya olunaraq vahid bir tip polipeptidi əmələ gətirən bir mRNT tipini yaradır (bax Şəkil 5-15).

İntronları olmayan bakterial və maya genlərindən fərqli olaraq, çoxhüceyrəli bitki və heyvan hüceyrələrinin mRNT-ləri intronlara malik olur və bunlar tam prosessinqdən keçən yetişmiş mRNT-lər şəkilində translyasiya üçün nüvədən sitozola keçməzdən öncə prosessinq nəticəsində uzaqlaşdırılır. Çox hallarda gendə intronlar eqzonlardan çox uzun olur. İnsan genlərində intronun orta uzunluğu 3.3 kə-dır. Amma, bəziləri daha çox uzun olurlar, insan geninin məlum olan ən uzun intronu 17106 əc-dür, bu intron əzələ toxumalarında eyni adlı quruluş zülalını kodlaşdıran ***TITIN*** geni daxilində yerləşir. Müqayisə üçün, insan eqzonlarının çoxu yalnız 50-200 əc-nə malik olurlar. Orta ölçülü zülal kodlaşdıran tipik insan geni təxminən ~50000 əc uzunluqda olur, amma bu ardıcıllığın 95 faizindən çoxunu intronlar və uclardan birləşmiş kodlaşdırmayan 5′ və 3′ rayonlar təşkil edirlər.

Ali orqanizmlərdə təkrarlanan domenlərə malik olan çox sayda böyük zülallar, biri-birindən müxtəlif uzunluqlarda olan intronlarla ayrılmış oxşar eqzonların təkrarından təşkil olunan genlərlə kodlaşdırılır. Buna bir misal kimi, hüceyrəxarici matrisanın komponenti olan fibronektini göstərmək olar. Fibronektin geni beş tip eqzonun çoxsaylı nüsxələrinə malikdir (bax Şəkil 5-16). Belə genlər çox ehtimal ki, Şəkil 8-2a-da göstərildiyi kimi, meyoz zamanı qeyri-bərabər krossinqover nəticəsində təkrarlanan eqzonları kodlaşdıran DNT-nin tandem (dəstə ilə) duplikasiyası ilə yaranıb inkişaf etmişdir.

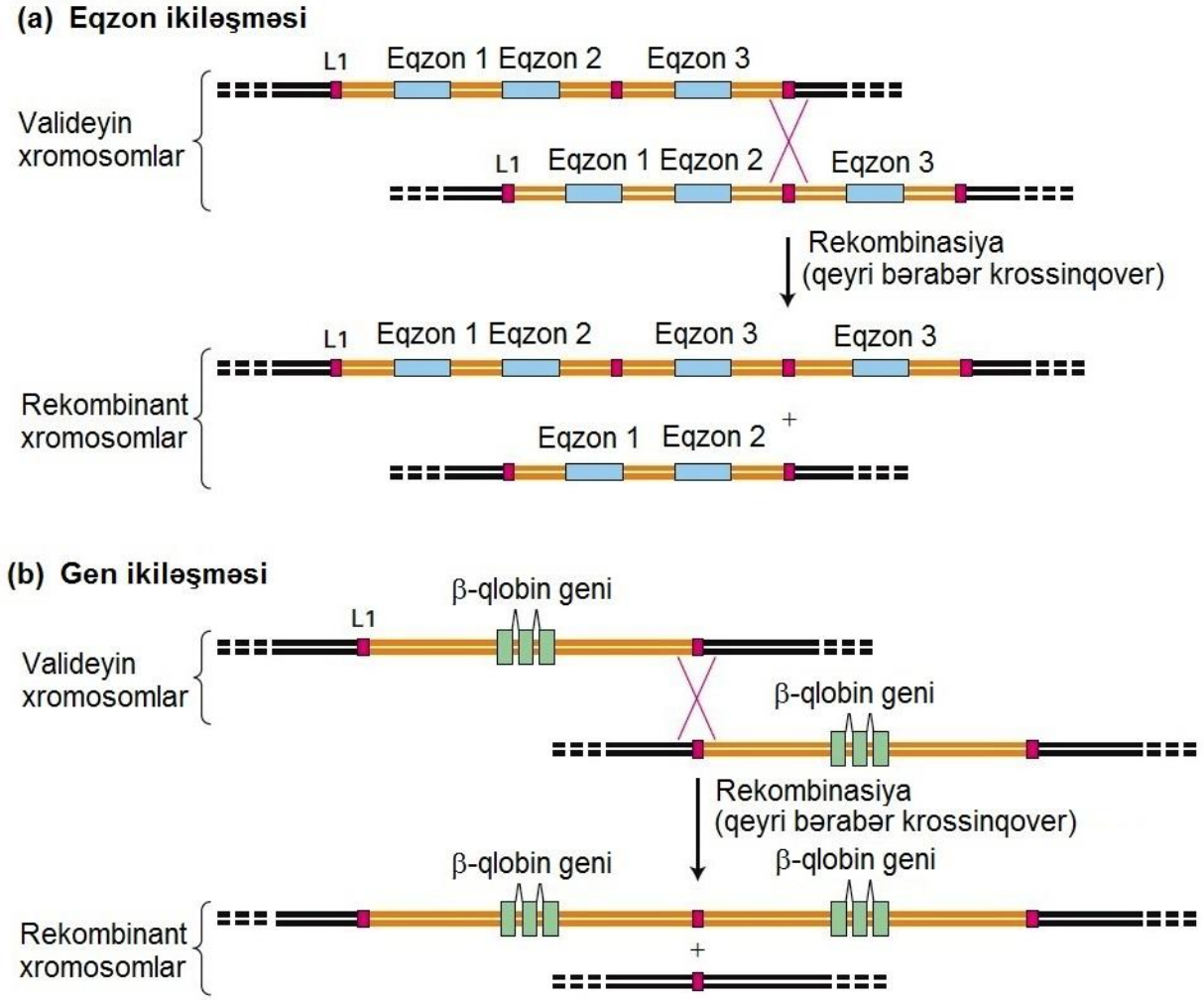
Eukariotik Genomlarda Sadə və Kompleks Transkripsiya Vahidləri Tapılmışdır

Bakterial operonu əmələ gətirən, tək transkripsiya vahidini təşkil edən genlər klasteri DNT ardıcıllığında spesifik promotordan terminasiya saytına qədər transkripsiya olunaraq vahid ilkin transkripti yaradır. Başqa sözlə, bir transkripsiya vahidi operonun tərkibi olan bir neçə genə malik olduğundan, prokariotlarda genlər və transkripsiya vahidləri çox hallarda fərqləndirilə bilirlər. Əksinə, eukariot genlərinin çoxu ayrıca bir transkripsiya vahidindən ekspressiya olunur və hər bir mRNT tək bir zülala translyasiya olunur.

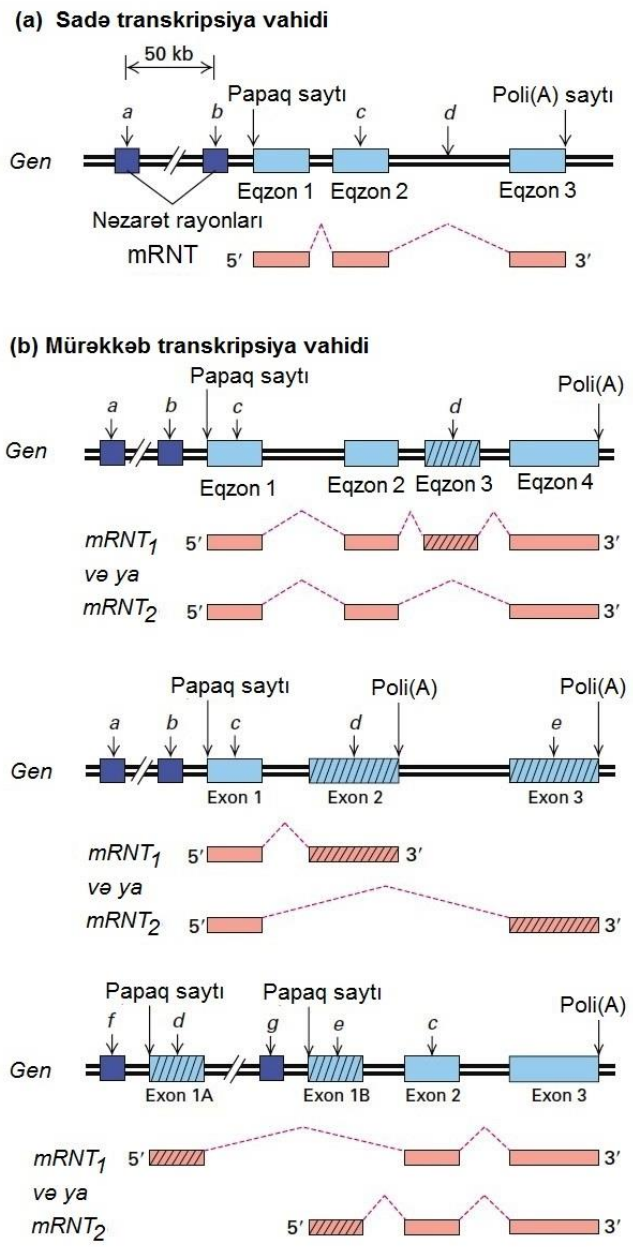
Amma, eukariotik transkripsiya vahidləri ilkin transkriptin müqəddaratından asılı olaraq iki tipə bölünürlər. Tək *sadə* transkripsiya vahidindən əmələ gələn ilkin transkript, məsələn β-qlobini kodlaşdıran transkripsiya vahidində (Şəkil 5-15) olduğu kimi, tək bir zülalı kodlaşdıran bir tip mRNT-ni əmələ gətirir. Eqzonlarda, intronlarda və transkripsiyaya nəzarət rayonlarında mutasiyalar, sadə transkripsiya vahidi tərəfindən kodlaşdırılan zülalın ekspressiyasına təsir edə bilir (Şəkil 8-3a). İnsanlarda β-qlobini kodlaşdıran transkripsiya vahidi kimi sadə

transkripsiya vahidləri seyrək hallarda olur. İnsanın transkripsiya vahidlərinin təxminən 90 faizi ***mürəkkəb*** (***kompleks***) olur. Bela olan halda, ilkin RNT transkript müxtəlif eqzonlara malik olan mRNT-ləri əmələ gətirən, birdən artıq müxtəlif yollarla prosessinq ola bilir. Amma, hər bir belə alterrnativ mRNT monosistrondur, yalnız bir polipeptidə translyasiya olunur və translyasiya bir qayda olaraq mRNT-də AUG start kodonu ilə inisiasiya olunur.

İlkin transkriptdən çoxsaylı mRNT-lər, Şəkil 8-3b-də göstərildiyi kimi, üç yolla yarana bilir. Hər üç alternartiv RNT prosessinqinə nümunə kimi *Drosophila*-da cinsi differensasiyanı tənzimləyən genlərin ekspressiyası zamanı baş verən prosessinqləri göstərmək olar (bax Şəkil 10-18). Ümumiyyətlə, kompleks (mürəkkəb) transkriptdən bəzi hüceyrələrdə bir mRNT tipi istehsal olunur, başqa tip hüceyrələrdə isə başqa tip mRNT istehsal olunur. Məsələn, əsas fibronektin transkriptinin **alternativ splaysinqi** fibroblastlarda və hepatositlərdə ifraz olunan zülalın hüceyrə səthinə yapışmaq qabliyyətini təmin edən domenin olub-olmadığını təyin edir (Şəkil 5-16). Alternativ splaysinq fenomeni ali orqanizmlərin genomunda kodlaşdırılan zülalların sayını böyük miqdarda artırır. Ehtimal olunur ki, insan genlərinin təxminən 90 faizi mürəkkəb transkripsiya vahidində yerləşir və bunların hər biri alternativ splaysinq yolu ilə fibronektinin fibroblast və hepatosit hüceyrələrində olan formaları kimi müxtəlif funksiyaya malik olan müxtəlif zülalları kodlaşdıran mRNT-ləri yaradırlar.



ŞƏKIL 8-2 Eqzon və Ggen duplikasiyası. (a) Eqzon duplikasiyası meyoz zamanı qeyri-bərabər krossinqover nəticəsində baş verir. Hər bir valideyin xromosomu (*yuxarıda*) üç eqzondan və iki introndan ibarət olan bir əcdad genə malikdir. Homoloji kodlaşdırmayan L1 adlanan uzun təkrarlanan elementlər genin 5′ və 3′ rayonunda və eqzon 2 və 3 arasındakı intronda yerləşirlər. Bizim bu fəsildə sonra görəcəyimiz kimi, L1 elementlər insanın təkamülü gedişində genomda təkrar-təkrar yerini yeni saytlara dəyişirlər (transpozisiya edirlər), beləliklə bunlar bütün xromosomlar boyu səpilmiş olurlar. Göstərilən valideyin xromosomlar bir-birlərinə nisbətən yerlərini elə dəyişirlər ki, L1 ardıcıllıqlar bərabər düzlənmiş olsunlar. L1 ardıcıllıqlar arasındakı göstərilən homoloji rekombinasiya bir rekombinant xromosomu yaradır, indi genin dörd eqzonu vardır (eqzon 3-ün iki nüxsəsi). (b) Eyni proses bütöv genin duplikatlarını yarada bilir. L1 ardıcıllıqlar arasındakı qeyri-bərabər rekombinasiyadan sonra, duplikasiya olunan genlər nəticəsində yaranan sərbəst mutasiyalar ardıcıllıqda kiçik dəyişikliyə səbəb ola bilir və nəticədə kodlaşdırılan zülallardan biri az fərqli funksiyaya malik olan zülallar əmələ gəlir. Qeyri-bərabər krossinqover oxşar olmayan ardıcıllıqlar arasındakı rekombinasiya nəticəsində də yarana bilir. Bax D.H.A. Fitch et al., 1991, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*,**88**:7396.



Mürəkkəb transkripsiya vahidi ilə münasibətdə mutasiya ilə gen arasındakı qarşılıqlı əlaqə həmişə sadə olmur. Nəzarət rayonundakı və ya alternativ splays olunmuş mRNT-lərlə ortaq olan eqzondakı mutasiya bu mürəkkəb transkripsiya vahidinin kodlaşdırdığı bütün alternativ zülallara təsir edəcək. Digər tərəfdən, alternativ mRNT-lərdən yalnız birində mövcud olan eqzondakı mutasiya yalnız bu mRNT-nin kodlaşdırdığı zülala təsir edəcək. Fəsil 6-də izah olunduğu kimi, genetik komplementasiya yoxlamaları iki mutasiyanın eyni və ya müxtəlif genlərdə olmasını təyin etmək üçün istifadə olunur (bax Şəkil 6-7). Amma, Şəkil 8-3b-də göstərilmiş (*ortada*) mürəkkəb transkripsiya vahidində ***d*** və ***e*** mutasiyaları, eyni gendə baş vermələrinə baxmayaraq genetik komplementasiya yoxlamalarında bir-birini tamamlamalıdır, çünki ***d*** mutasiyalı xromosom $mRNT_2$ ilə kodlaşdırılan zülalı normal ekspressiya etməlidir, ***e*** mutasiya ilə olan xromosom isə $mRNT_1$ ilə kodlaşdırılan zülalı normal ekspressiya etməlidir. Bu gendən istehsal olunmuş hər iki mRNT hər iki mutasiyanı daşıyan və hər iki zülal məhsulunu istehsal edən, beləliklə təbii forma fenotipini yaradan diploid hüceyrələrdə mövcud olmalıdır. Amma, hər iki mRNT üçün ümumi olan eqzonda ***c*** mutasiyasıyanı daşıyan xromosom nə *d* mutasiyanı, nə də *e* mutasiyanı tamamlamayacaq. Başqa sözlə, hətta ***d*** və ***e*** mutasiyaları özləri eyni komplementasiya qrupunda olmasalar da belə, ***c*** mutasiyası ***d*** və ***e*** mutasiyaları ilə eyni komplementasiya qrupunda olmalıdır. Genin genetik mənasının belə mürəkkəb olduğuni nəzərə alaraq, genomun bu bölmənin başlanğıcında verilmiş təyini çox istifadə olunur. Zülal kodlaşdıran genlər olan halda, gen transkripsiya vahidinə və ilkin transkriptin sintezi üçün tələb olunan istənilən digər tənzimləyici elementlərə ekvivalent olan pre-mRNT sələfə transkripsiya olunan DNT ardıcıllığıdır. Bir gendən ekspressiya olunan, alternativ splays olunmuş mRNT-lər tərəfindən kodlaşdırılan müxtəlif zülallar **izoformalar** adlanır.

ŞƏKİL 8-3 Eukariotlarda sadə və mürəkkəb transkripsiya vahidləri. (a) Sadə transkripsiya vahidinə, 5′ papaqdan 3′ poli (A) quyruğa qədər bir zülalı kodlaşdıran rayon və ona birləşmiş nəzarət rayonları daxildir. İntronlar eqzonlar arasında yerləşirlər (açıq mavi dördbucaqlılar) və prosessinq zamanı ilkin transkriptdən uzaqlaşdırılırlar (qırmızı qırıq xətlər); beləliklə bunlar funksional monosistron mRNT-də ortaya çımırlar. Transkripsiyanın nəzarət rayonunda mutasiyalar (*a, b*) transkripsiyaya mane olurlar və ya onu azalda bilirlər, beləliklə kodlaşdırılan zülalların azalmasına və ya tamamilə yox olmasına səbəb olurlar. Eqzon daxilində baş verən mutasiya (*c*) azalmış fəallığa malik olan qeyri-normal zülalın yaranmasına səbəb olur. İntron daxilindəki mutasiya (*d*) orada yeni splaysinqin yaranmasına səbəb olur və nəticədə qeyri-funksional zülalı kodlaşdıran qeyri-normal splaysinq olunmuş mRNT yaranır. (b) Mürəkkəb transkripsiya vahidi alternativ prosessinq oluna bilən əsas transkripti yaradır. (*Yuxarıda*) Əgər əsas transkript alternativ splaysinq saytlarına malikdirsə, o eyni 5′ və 3′ eqzonlara malik olan, amma daxili eqzonları fərqli olan mRNT-lərə prosessinq oluna bilər. (*Ortada*) Əgər əsas transkripti iki poli (A) saytına malikdirsə, o alternativ 3’ eqzonları olan mRNT-yə prosessinq oluna bilər. (*Aşağıda*) Əgər alternativ promotorlar (***f*** və ya ***g***) fərqli hüceyrə tiplərində fəaldırlarsa, ***f***-in fəallaşdığı hüceyrə tipində istehsal olunan $mRNT_1$–in birinci eqzonu (1A istifadə olunmuşdur) ***g***-nin fəallaşdığı hüceyrə tipində istehsal olunan $mRNT_2$-nin birinci eqzonundan (eqzon 1B istifadə olunmuşdur) fərqli olacaq. Alternativ mRNT-lərə görə ortaq olan nəzarət rayonundakı mutasiyalar (*a* və *b*) və eqzon daxilində *c* ilə işarə olunan mutasiyalar hər iki alternativ prosessinq olunmuş mRNT-lər tərəfindən kodlaşdırılan zülala təsir edirlər. Əksinə, alternativ prosessinq olunmuş mRNT-lərin birinə məxsus (unikal) olan eqzon daxilindəki mutasiyalar (*d* və *e* ilə işarə olunanlar) yalnız bu mRNT-dən translyasiya olunan zülala təsir edir. Fərqli hüceyrə tiplərində fərqli promotorlardan transkripsiya olunan genlərdə (*aşağıda*), müxtəlif nəzarət rayonlarında olan mutasiyalar (***f*** və ***g***) ekspressiyaya yalnız bu nəzarət rayonunun fəal olduğu hüceyrə tipində təsir edir.

Zülal Kodlaşdıran Genlər Tək-tək Ola Bilirlər və ya Gen Ailəsinə Mənsub Olurlar

Xromosom DNT-si daxilində nukleotid ardıcıllığı əsas quruluşuna və funksiyalarına görə Cədvəl 8-1-də göstərildiyi

kimi təsnifləşdirilə bilər. Biz iki qrupun əhatə etdiyi zülal kodlaşdıran ardıcıllıqlardan başlayaraq hər bir sinifin xüsusiyyətlərini tədqiq edəcəyik. Çoxhüceyrəli orqanizmlərdə

zülal kodlaşdıran genlərin təxminən 25-50 faizi haploid genomlarda yalnız bir dəfə təmsil olunur, ona görə də ***tənha*** (***solitary***) genlər adlandırılır. Tənha zülal kodlaşdıran genlərin yaxşı öyrənilmiş nümayəndəsi toyuğun lizozim genidir. Lizozim bakteryaların hüceyrə divarında polisaxaridləri parçalayan fermentdir, toyuq yumurta-ağı zülallarının zəngin komponentidir, həmçinin insanın göz yaşında tapılmışdır. Onun fəallığı yumurtanın və göz səthinin steril saxlanmasına köməkdir. Toyuyğun lizozim zülalını kodlaşdıran 15-kə ölçüdə olan bu DNT ardıcıllığı, dörd eqzondan və üç introndan ibarət olan sadə transkripsiya vahidini təşkil edir. Transkripsiya vahidindən yuxarıya və aşağıya doğru uzanan 20 kə ölçülü cinahdan birləşmiş rayonlar aşkar oluna bilən heç bir mRNT-ni kodlaşdırmırlar, ona görə də genlərarası rayonun gözəl bir nümunəsidir. *Duplikasiya olunmuş* genlər zülal kodlaşdıran genlərin ikinci qrupunu təşkil edirlər. Bunlar çox oxşar olub, amma identik olmayan ardıcıllığa malikdirlər və çox hallarda bir-biri ilə 5-50 kə məsafədə yerləşirlər. Oxşar, amma identik olmayan aminturşu ardıcıllığına malik olan zülalları kodlaşdıran duplikasiya olunmuş genlər dəsti **gen ailəsi** adlandırılır; bir-birinə çox yaxın olan kodlaşdırılmış homoloji zülallar **zülallar ailəsini** təşkil edirlər. Proteinkinazalar, məməlilərin immunoqlobulinləri və qoxubilmə reseptor zülalları kimi bir neçə zülal ailələri yüzlərlə nümayəndələrə malikdirlər. Amma, zülal ailələrinin çoxu bir neçədən 30-a qədər və ya buna yaxın nümayəndəyə malik olurlar; bunlara geniş yayılmış bir nümunə sitoskelet zülallarını, miyozinin ağır zəncirini, və onurğalılarda α-bənzər və β-bənzər qlobinləri göstərmək olar.

β-bənzər qlobinləri kodlaşdıran genlər gen ailələri üçün yaxşı nümunədir. Şəkil 8-4a-da göstərildiyi kimi, β-bənzər qlobin zülal ailəsi HBB (yetkin β-qlobinin çox zəngin hissəsini kodlaşdıran), *HB*D (kiçik yetkin β-qlobin), *HBG1* və *HBG2* (fetal β-qlobinlər) və *HBE1* (embrion β-qlobin) kimi işarələnənən beş funksional genlərə malikdir. İki eyni β-bənzər qlobin polipeptidlər hemoqlobin molekulunu əmələ gətirmək üçün iki eyni (başqa gen ailəsinin kodlaşdırdığı, inkişafın embrion, fetal və yetkin dövründə ekspressiya olunan) α-bənzər qlobin polipeptidlərlə və dörd kiçik hem qruplarla kombinasiya olunurlar (bax Şəkil 3-14 və 12-20). Müxtəlif α-bənzər və β-bənzər qlobinlərdən formalaşan bütün hemoqlobinlər qanda oksigeni daşıyırlar, amma onlar insanın fiziologiyasında onlara xüsusi funksiyanı verən müəyyən fərqli xassələrə malikdirlər. Məsələn, *ABG1*-, və ya *HBG2*-kodlaşdırılan polipeptidlər yalnız fetal (rüşeyim) inkişaf dövründə ekspressiya olunurlar. Çünki bu rüşeyim hemoqlobinləri yetkin fərdin hemoqlobininə nisbətən oksigenə daha yüksək uyğunluğa (affinliyə) malikdirlər, onlar plasenta vasitəsi ilə ananın qanından asanlıqla oksigeni ayırıb götürə bilirlər. Doğulduqdan sonra ekspressiya olunan yaşlı fərdin hemoqlobinində olan oksigenə aşağı affinlik oksigenin toxumalara, xüsusən də hərəkətlər zamanı daha çox oksigenə tələbatı olan əzələ toxumalarına asanlıqla buraxılmasını təmin edir.

Fərqli β-qlobin genlər əcdad genin duplikasiyası nəticəsində əmələ gəlmişdir, çox guman ki, rüşeyim hüceyrəsinin inkişafı (yumurta və ya sperma, bax Şəkil 8-2b) zamanı meyoz rekombinasiyası prosesində "qeyri-bərabər krossinqover" nəticəsində yaranmışdır. Təkamül prosesində genin təsadüfi mutasiyalarının toplanması nəticəsində yaranmış

CƏDVƏL 8-1 Eukariotik Nüvə DNT-sinin Əsas Sinifləri və Onların İnsan Genomunda Təzahüri

Sinif	Uzunluğu	İnsan genomunda nüsxələrinin sayı	İnsan genomunda fraksiysı (%)
Zülal kodlaşdıran genlər	0.5-2200 kə	~21000	~40** (2.0†)
Uzun kodlaşdırmayan RNT genləri	0.2-50 kə	~10000	~15 (0.9†)
Tandem təkrarlanan genlər			
U2 snRNT	6.1kə‡	~20	<0.0001
rRNTlər	43kə‡	~300	0.4
Təkrarlanan DNT			
Sadə ardıcıllıqlı DNT	1-500əc	Dəyişkən	~6
Aralıq təkrarlanan (mobil DNT elementləri)			
DNT transpozonlar	2-3kə	300000	3
LTR retrotranspozonlar	6-11kə	440000	8
Qeyri-LTR retrotranspozonlar			
LINE-lər	6-8kə	860000	21
SINE-lər	100-400əc	1600000	13
Prosessinq olunmuş psevdogenlər	Dəyişkən	12500	~0.4
Genlərarası rayonlar	Dəyişkən	a.y.	~25

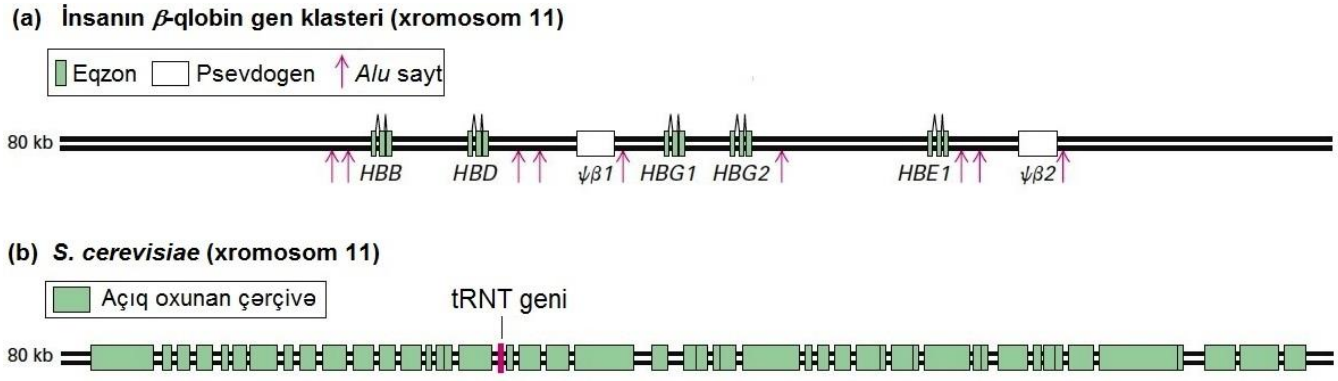
* "İnsan genomunun summar fraksiyası (%)", mobil DNT elementləri iki dəfə sayıldığından 100%-dən artıq təşkil edir: birinci dəfə insanın mobil DNT elementlərinin müxtəlif siniflərini göstərmək üçün, ikinci dəfə isə genlərarası rayonların bir hissəsini və intronlarda və terminal eqzonların 3′ translyasiya olunmayan rayonlarında yerləşən zülal kodlaşdıran genləri göstərmək üçün.

**Eqzonlar və intronlar daxil olmaqla tam transkripsiya vahidləri

†Eqzonların ümumi uzunluğu. Zülal-kodlaşdıran rayonlar (eqzonlar) ümumi genomun 1.2 faizini təşkil edir

‡Tandem təkrarlanan ardıcıllıqda hər bir təkrarın uzunluğu.

MƏNBƏ: Beynəlxalq İnsan Genomu Ardıcıllığı Konsortumu, 2001, *Nature***409**:860 və 2004, *Nature* **431**:931.



ŞƏKİL 8-4 Ali və ibtidai eukariotlarda gen sıxlığının müqayisəsi. (a) Diaqramda insanın 11-ci xromosomundakı β qlobin gen klasteridir, yaşıl bokslar β-qlobinə yaxın olan genlərin eqzonlarını tərənnüm edir. mRNT-dən birini yaratmaq üçün birlikdə splays olunmuş eqzonlar iti çıxıntılarla birləşdirilmişlər. İnsanın β-qlobin gen klasteri iki psevdogenə malikdir (ağ rəngli), bu rayonlar funksional qlobin-tipli genlərə qohumdurlar, amma transkripsiya olunmurlar. Hər bir qırmızı ox, insan genomunda çox olan, təxminən ~300-əc uzunluqda kodlaşdırmayan təkrarlanan ardıcıllıq - *Alu* ardıcıllığının yerləşməsini göstərir. Bax F.S. Collins and M.Weissman, 1984, *Prog.Nucl.Acid.Mol.Biol*. **31**:315. (b) Diaqramda maya göbələyinin III xromosomunun DNT-si verilmişdir, yaşıl bokslar açıq oxunan çərçivəni göstərir. Bu potensial zülal kodlaşdıran ardıcıllıqların çoxu intronsuz funksional genlərdir. Diqqət yetirin ki, insanın DNT-sində kodlaşdırmayan genlərin kodlaşdıran genlərə nisbəti maya göbələyi DNT-sindən çox-çox yüksəkdir. Bax S.G. Oliver et al., 1992, *Nature* **357**:28.]

iki nüsxəsi *ardıcıllığın sürüşməsi* (*sequence drift*) ilə nəticələnmişdir. Hemoqlobinin əsas oksigen daşıyan funksiyasında bir sıra incəlikləri yaratmış faydalı mutasiyalar təbii seçmə yolu ilə qorunub saxlanmışdır. Təkrarlanan gen duplikasiyası və onun ardınca baş verən ardıcıllığın sürüşməsi, guman olunur ki, bu gün insanda və digər məməlilərdə müşahidə olunan müasir qlobinə bənzər genləri yaratmışdır.

İnsanın β-bənzər qlobin gen klasterında iki rayon funksional β-bənzər qlobin genlərə oxşar olan, **psevdogenlər** adlanan qeyri-funksional ardıcıllığa malikdir (bax Şəkil 8-4a).

Ardıcıllıq analizləri göstərir ki, bu psevdogenlər β-bənzər qlobin genlərdə olduğu kimi oxşar görünən eqzon-intron quruluşa malikdirlər, bu onu göstərir ki, onlar da eyni əcdad genin duplikasiyası nəticəsində yaranmışlar. Amma, bu genlərin funksiyasının saxlanılması üçün kiçik seçim "təzyiqi" olmuşdur. Uyğun olaraq təkamül prosesində ardıcıllıq axını ya mRNT prosessinqini blok edən ya da translyasiyanı terminasiya edən (dayandıran) ardıcıllığı yaradaraq bu rayonları qeyri-funksional etmişdi. Bu cürə psevdogenlər ziyanlı olmadığından onlar genomda saxlanılmış və əcdadlarımızda meydana çıxan gen duplikasiyasının yerini işarələmişlər.

Xromosom seqmentlərinin duplikasiyası (*seqmental duplikasiya* adlanır) çoxhüceyrəli heyvan və bitki orqanizmlərinin təkamülü prosesində çox tez-tez meydana gəlmişdir. Nəticədə, bu gün bu orqanizmlərdə genlərin böyük fraksiyası duplikasiya olunmuş və yeni gen ailələrinin və psevdogenlərin yaranmasına səbəb olan ardıcıllıq axınına imkan yaratmışdır. Genomun duplikasiya olunmuş nüsxələri arasında ardıcıllığın divergensiyasının ölçüsü və yaxın orqanizmlərdə homoloji gen ardıcıllıqlarının xarakterizə olunması imkan verir ki, təkamülün inkişafı prosesində duplikasiyanın baş verdiyi tarixi zaman hesablansın. Məsələn, insanın rüşeyim qlobin genləri (HGB1 və HGB2) təxminən 50 million il əvvəl ümumi əcdad olan katarrhin (darburun) primatların (Köhnə Dünyanın meymunları, insana bənzər meymunlar və insanlar) və platirrhin primatların (Yeni Dünyanın meymunları) tək bir *HSB*-qlobin geninə daxil olan β-qlobin lokuslarının 5.5 kə rayonunun duplikasiyası nəticəsində yaranmışdır.

Baxmayaraq ki, təkamülün nisbətən son zamanlarında insanın meydana gəlmiş β-qlobin lokusları kimi gen ailələri çox zaman eyni xromosomda bir-birinə yaxın yerləşmiş vəziyyətdə tapılmışdır, gen ailələrinin nümayəndələri eyni orqanizmin fərqli xromosomlarında da tapıla bilər. Buna misal kimi, insanın α-qlobin genini göstərmək olar, təkamül prosesində qədim xromosom translokasiyası zamanı β-qlobin genlərindən ayrılmışlar. Həm α-qlobin, həm də β-qlobin genləri vahid bir əcdad qlobin genindən törəmişlər. Bu qlobin gen duplikasiya olunaraq məməlilərdə müasir α- və β-qlobin genlərin sələfini yaratmışdır (bax Şəkil 8-2b). Hər iki əzəli (primordial) α- və β-qlobin genləri sonrakı duplikasiyalara uğrayaraq bu gün məməlilərdə tapılmış fərqli α- və β-qlobin gen klasterlərini yaratmışlar.

Bir sıra fərqli gen ailələri, hüceyrə skelet sistemini yaradan müxtəlif zülalları kodlaşdırırlar. Bu zülallar demək olar ki, bütün hüceyrələrdə müxtəlif miqdarda mövcuddurlar. Onurğalılarda əsas sitoskelet zülalları aktinlər, tubulinlər və Fəsil 17, 18, və 20-də müzakirə olunan aralıq filament zülalları- keratinlərdir. Biz, Bölmə 8.4-də belə ailələrdən birinin, tubulin ailəsinin mənşəyini tədqiq edirik. Hərçənd ki, sitoskeletal zülal ailələrinin fizioloji məntiqi qlobin zülallarda olduğu qədər aydın deyildir, lakin ailənin müxtəlif nümayəndələri demək olar ki oxşar amma, ekspressiya olunduqları xüsusi hüceyrə tipinə uyğun olaraq müəyyən qədər (cüzi) fərqli funksiyaya malik olurlar.

Çox İstifadə Olunan Gen Məhsulları Genlərin Çoxsaylı Nüsxələri Tərəfindən Kodlaşdırılır

Onurğalılarda və onurğasızlarda, ribosomal RNT-ləri və bəzi digər zülal kodlaşdırmayan RNT-ləri, məsələn RNT spalysinqində iştirak edən RNT-ləri kodlaşdıran genlər ***dəstə ilə (tandem) təkrarlanan düzülüşü (array)*** əmələ gətirirlər. Bu

çoxsaylı tandem təkrarlanan genlər gen ailələrinin duplikasiya olunmuş genlərindən onunla fərqlənirlr ki, onlar identik və ya həddən artıq yaxın zülalları və ya mRNT-ləri kodlaşdırırlar. Daha çox hallarda, bu ardıcıllıqların nüsxələri DNT-nin uzun zənciri boyunca bir-birindən sonra başdan-quyruğa formasında görünürlər. rRNT genlərinin dəstə ilə düzülüşü (tandem array) daxilində hər bir nüsxə digərləri ilə eyni olur. Hərçənd ki, rRNT genlərinin transkripsiya olunan hissələri verilmiş fərd üçün eynidir, amma transkripsiya olunan rayonlar arasındakı transkripsiya olunmayan sahə rayonların uzunluğuna və ardıcıllığına görə fərqlənə bilirlər.

Bu dəstə ilə (tandem) təkrarlanan RNT genləri hüceyrənin onların transkriptlərinə olan çox böyük tələbatına görə yaranmışdır. Bunun nəyə görə belə olduğunu anlamaq üçün, genin RNT polimeraza molekulları ilə tam yükləndiyi zaman bir hüceyrə generasiyası dövründə müəyyən edilmiş maksimum miqdarda RNT nüxsələrinin bir gendən istehsal oluna biləcəyini düşünün. Əgər bir genin transkripsiya edə biləcəyindən daha çox RNT tələb olunarsa o zaman bu genin çoxsaylı nüsxələrinin olması lazımdır. Məsələn, insanda embrionun erkən inkişaf dövründə rüşeyim hüceyrələrinin çoxunda ikiləşmə (duplikasiya) dövrü ~24 saat çəkir və onlar 5-10 million ribosoma malik olurlar. Bu qədər çoxsaylı ribosomları yaratmaq üçün kifayət qədər rRNT istehsalını təmin etmək üçün insanın rüşeyim hüceyrəsində rRNT-nin böyük və kişik subvahidlərinin genlərinin ən azı 100 nüsxəsi lazımdır və bunların hamısı maksimum fəal vəziyyətdə olmalıdır ki, hüceyrə hər 24 saatdan bir bölünə bilsin. Ona görə də, çoxsaylı RNT polimerazalar hər bir rRNT genini eyni zamanda transkripsiya etməlidir (bax Şəkil 10-39). Həqiqətən də, maya da daxil olmaqla bütün eukariotlar 5S rRNT-ni və rRNT-nin böyük və kiçik subvahidlərini kodlaşdıran genlərin 100 və ya daha çox nüsxəsinə malikdirlər.

tRNT-ni kodlaşdıran genlərin və histon zülallarını kodlaşdıran genlərun də çox saylı nüsxələri vardır. Bu fəsildə bizim sonralar görəcəyimiz kimi, histonlar birləşərək DNT-nin quruluşunun təşkilində iştirak edirlər. Hüceyrələrin kifayət qədər ribosomal və tRNT-ləri istehsal etmək üçün çoxsaylı rRNT və tRNT genlərini tələb etdikləri kimi, hər bir hüceyrə bölünməsi zamanı istehsal olunan çoxsaylı nüvə DNT-lərini birləşdirmək üçün tələb olunan böyük miqdarda histon zülallarının istehsalından ötrü histon genlərinin də çoxsaylı nüsxələri tələb olunur. tRNT və histon genləri çox hallarda klaster halında yerləşdiyindən, onlar genomda dəstələr şəkilində düzümü (tandem array) əmələ gətirmirlər.

Cədvəl 8-2 Məlum Olan Zülül Kodlaşdırmayan RNT-lər və Onların Funksiyaları

RNT	İnsan genomunda genlərin sayı	Funksiyaları
rRNT-lər	~300	Zülalların sintezində
tRNT-lər	~500	Zülalların sintezində
snRNT-lər	~40	mRNT splaysinqində
U7 snRNT	1	Histon mRNT 3′ prosessinqində
snoRNT-lər	~85	Pre-rRNT prosessinqi və rRNT modifikasiyası
miRNT-lər	~2000	Gen ekspressiyasının tənzimlənməsi
Xist	1	X-xromosomun fəalsızlaşması
7SK	1	Transkripsiyaya nəzarət
RNaza P RNT	1	tRNT-nin 5′ prosessinqində
7SL RNT	3	Zülal ifrazı, siqnal tanıyan zrrəciyin, SRP komponenti
RN-aza MRP RNT	1	rRNT prosessinqi, mtDNT* replikasiyası
Telomeraza RNT	1	Telomerlərin əlavə olunması üçün templeyt
Atılan RNT	3	Ehtiyat ribonuklezülalların komponenti (RNP-lər), funksiyası məlum deyil
hY1, hY3, hY4, hY5	~30	Ribonukleozülalların komponenti (RNP-lər), funksiyası məlum deyil
H19	1	Məlum deyil

* Mitoxondri DNT-si

MƏNBƏ: Verilənlər Human Genome Sequensing Consortum, 2001, *Nature* **40**9: 860 və P.D.Zamore and B.Haley, 2005, Science **309**:1519.

Zülal Kodlaşdırmayan Genlər Funksional RNT-ləri Kodlaşdırırlar

rRNT və tRNT genlərindən başqa minlərlə əlavə genlər vardır ki, zülal kodlaşdırmayan RNT-lərə transkripsiya olunurlar, onlardan bəzilərinin funksiyası məlumdur, amma çoxunun funksiyası hələ məlum deyil. Məsələn, **kiçik nüvə RNT-ləri** (**snRNT-lər**) RNT splaysinqində fəaliyyət göstərirlər və **kiçik nüvəcik RNT-lər** (**snoRNT-lər**) nüvəcikdə rRNT prosessinqində və əsasların modifikasiyasında fəaliyyət göstərirlər. **RN-aza P RNT** tRNT prosessinqində fəaliyyət göstərir, qısa **mikro RNT-lərin (miRNT-lar**) böyük ailəsi (təxminən ~1000) isə spesifik mRNT-lərin translyasiyasını və stabilliyini tənzimləyirlər. Zülal kodlaşdırmayan bu RNT-lərin funksiyaları Fəsil 10-da müzakirə olunur. Telomerazalarda tapılan RNT-lər (bax aşağıda Şəkil 8-44) xromosomların

uclarında ardıcıllıqların qorunub saxlanmasında iştirak edirlər, 7SL RNT isə ifraz olunmuş zülalların və membran zülallarının əksəriyyətinin endoplazmatik şəbəkəyə importunda fəaliyyət göstərir (bax Fəsil 13). Bunlar və insan genomunda kodlaşdırılan digər zülal kodlaşdırmayan RNT-lər və onların funksiyası, nə vaxt məlum olmaları Cədvəl 8-2-də verilmişdir. DNT ardıcıllığının ounmasında son zamanların uğurları məməlilərin hüceyrələrinin nüvəsində 10000 qədər *uzun kodlaşdırmayan* RNT-lərin (lncRNT) aşkar olunmasına gətirib çıxardı. Bunların bəzilərinin spesifik zülal kodlaşdıran genlərin ekspressiyasının tənzimlənməsində fəaliyyəti aşkar edilmişdir. lncRNT-lərin funksiyasının öyrənilməsi hal-hazırda fəal öyrənilən tədqiqat sahəsidir.

8.1 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Eukariot Genlərin Quruluşu

- Molekulyar tərifə görə gen funksional zülal və ya RNT molekulunun sintezi üçün tələb olunan bütöv DNT ardıcıllığıdır. Kodlaşdırıcı rayonlara (eqzonlar) əlavə olaraq genə nəzarət rayonları və çoxhüceyrəli heyvanlarda və bitkilərdə əksər genlərdə intronlar da daxil olur.
- Sadə eukariotik transkripsiya vahidi tək bir zülala translyasiya olunan tək monosistron mRNT-ni istehsal edir.
- Eukariotlarda mürəkkəb transkripsiya vahidi ilkin transkriptə transkripsiya olunur, o isə splays saytının və ya poliadenilləşmə saytının seçimindən asılı olaraq iki və daha artıq müxtəlif monosistron mRNT-lərə prosessinq oluna bilir. Alternativ promotora malik olan kompleks transkripsiya vahidi də müxtəlif hüceyrələrdə iki və daha artıq mRNT-ləri yarada bilirlər (bax Şəkil 8-3b).
- Çoxsaylı mürəkkəb transkripsiya vahidləri (məsələn fibronektin geni) bir hüceyrə tipində bir mRNT-ni, başqa hüceyrə tipində isə alternativ mRNT-ni ekspressiya edir.
- Onurğalıların genom DNT-sində zülal kodlaşdıran genlərin təxminən yarısı tənha genlərdir və haploid genomda yalnız bir dəfə rast gəlinir. Qalanlar isə duplikasiya olunmuş genlərdir, yəni əcdad gendən duplikasiya olunmaqla və sonra da müstəqil mutasiya olunmaqla meydana gəlmişlər (bax Şəkil 8-2b). Gen ailələri tərəfindən kodlaşdırılan zülallar homologiya təşkil edirlər, amma eyni amin turşu ardıcıllığına malik deyillər və bir-birinə çox oxşar olan, amma az fərqlənən xassəyə malikdirlər.
- Onurğasızlarda və onurğalılarda rRNT-lər genom DNT-sində dəstə şəklində düzülmüş genlərin çoxsaylı nüsxələri ilə kodlaşdırılırlar. tRNT-lərin, snRNT-lərin və histon genlərinin çoxsaylı nüsxələri çox hallarda tandem dəstə şəkilində düzülmür, əsasən klaster şəklində yerləşirlər.
- Çox genlər zülallara translyasiya olunmayan funksional RNT-ləri də kodlaşdırırlar, amma onlar rRNT, tRNT və snRNT kimi əhəmiyyətli funksiyaları həyata keçirirlər. Bunlar arasında gen ekspressiyasının tənzimlənməsində bioloji əhəmiyyəti son zamanlar aydınlaşdırılmış mikro-RNT-lər vardır. Son zamanlar aşkar edilmiş minlərlə uzun nüvə kodlaşdırmayan RNT-lərin (lncRNT) funksiyasının aydınlaşdırılması intensiv öyrənilən tədqiqat sahəsidir.

8.2 Genlərin və Kodlaşdırmayan DNT-nin Xromosomal Təşkili

Biz, transkripsiya vahidləri arasında əlaqəni öyrəndikdən sonra, indi genlərin xromosomda təşkilinə və kodlaşdırmayan DNT ardıcıllıqlarının kodlaşdıran ardıcıllıqlarla əlaqələrinin öyrənilməsinə başlayırıq.

Çox Orqanizmlərin Genomu Qeyri-funksional DNT-yə Malikdir

Müxtəlif növlərdə hüceyrələr üzrə ümumi xromosom DNT-sinin müqayisəsi ilk dəfə göstərdi ki, müəyyən orqanizmlərdə DNT-nin çoxu RNT kodlaşdırmır və ya hər hansı bir tənzimləyici funksiyaya malik deyil. Məsələn, maya, meyvə milçəyi, toyuq və insan haploid xromosom dəstlərində ardıcıl olaraq daha çox DNT-yə malikdirlər (uyğun olaraq 12.5; 180; 1300; 3300 Mə), bu ardıcıllıq da bizim qəbul etdiyimizə kimi bu orqanizmlərin artan mürəkkəbliyinə uyğun gəlir. Hələ ki, hər bir hüceyrəyə görə ən çox DNT-yə malik olan onurğalı orqanizm amfibialardır və əminliklə deyə bilərik ki, bunlar quruluşuna və davranışına görə insanla müqayisədə daha az mürəkkəbliyə malikdir. Hətta daha təəccüblüsü odur ki, bir hüceyrəli ibtidai növ *Amoeba dubia* bir hüceyrəyə görə insandan 200 dəfə artıq DNT-yə malikdir. Çox bitki növlərində də bir hüceyrədə olan DNT-nin miqdarı insandakından kifayət qədər çoxdur. Məsələn, zanbaqlar bir hüceyrəyə görə insandan 10 dəfə artıq DNT-yə malikdir. Bir hüceyrədəki DNT-nin miqdarına görə bir-birinə yaxın olan növlər də fərqlənirlər. Bütün həşaratlar və ya bütün amfibialar eyni dərəcədə mürəkkəbliyə malik olmalıdırlar, amma haploid DNT-nin miqdarı bu filogenetik siniflərin hər biri daxilində 100 dəfəyə qədər fərqlənir.

Xromosomal DNT-də ardıcıllıq analizi və eqzonların identifikasiyası birbaşa dəlillərlə sübut edir ki, ali eukariotların genomu böyük miqdarda kodlaşdırmayan DNT-yə malikdir. Məsələn, insanlarda β-qlobin gen klasterinin yalnız təxminən 80 kə uzunluqda olan kiçik bir hissəsi zülal kodlaşdırır (bax, Şəkil 8-4a). Əksinə, tək hüceyrəli eukariot *S. cerevisiae* mayada tipik 80-kə uzunluqda DNT bir-birinə yaxın yerləşmiş, intronsuz və kifayət qədər çox az kodlaşdırmayan DNT-si olan zülal kodlaşdıran ardıcıllıqlara malikdir (bax Şəkil 8-4b). Üstəlik qlobin genlərdə olan intronlar insan genlərinin çoxunda olan intronlarla müqayisədə kifayət qədər qısadır. Qlobin zülallar inkişaf etməkdə olan qırmızı qan hüceyrələrində (eritroid sələflərdə) olan ümumi zülalların 50 faizə qədərini təşkil edir və qlobin genlər maksimum dərəcədə (sürətlə) ekspressiya olunurlar (başqa sözlə, əvvəlki RNT-polimeraza inisiasiya edərək promotordan kifayət qədər məsafəyə uzaqlaşan kimi yeni RNT-polimeraza yeni transkripsiyanı inisiasiya edir). Nəticədə, qlobin genlərdə kiçik intronların yaranması üçün selektiv təzyiq olmuşdur ki, bu da qlobin mRNT-lərin tələb olunan yüksək sürətli transkripsiyasına və prosessinqinə uyğun gəlir. Amma, insan genlərinin böyük əksəriyyəti, onlarla dəqiqə və ya saatlar miqyasında yalnız bir kodlaşdırılmış mRNT-nin istehsalının tələb etdiyi zaman müddətində çox aşağı səviyyədə ekspressiya olunurlar. Nəticədə, insan genlərinin əksəriyyətində intronların ölçüsünü kiçiltmək üçün kiçik selektiv (seçimli) təzyiq olmuşdur.

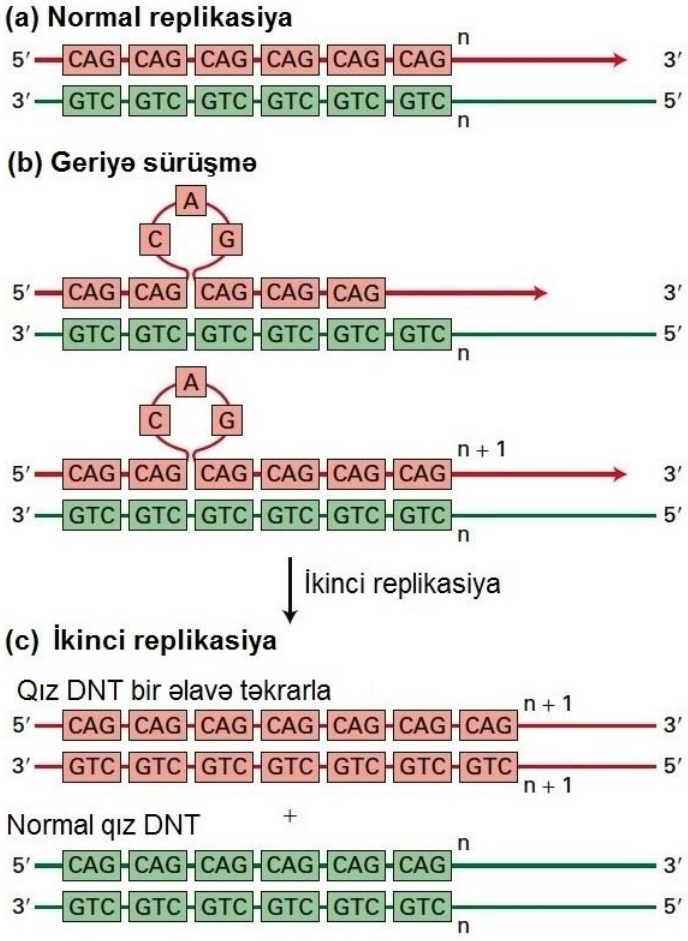
İnsanın xromosom DNT-sinin müxtəlif rayonlarında genlərin sıxlığı, transkripsiya vahidlərinin bir neçə yüz əsas cütü ilə ayrıldığı "genlə-zəngin" rayonlardan, genlərarası rayonun bir neçə million əsas cütü qədər olduğu genlə kasıb olan böyük "gen-səhrası"-na qədər çox dəyişilir. İnsanın oxunmuş 96 faiz genom DNT ardıcıllığından ~2.9 faizi zülal kodlaşdıran ardıcıllıqlara (eqzonlara) aiddir və yalnız 1.2 faizə qədəri zülalı kodlaşdırır. (Genomun eqzonlara aid olan fraksiyası onun zülal kodlaşdıran fraksiyasından çox böyükdür, ona görə ki, çox zülal kodlaşdıran genlərdə uzun 3′ translyasiya olunmayan rayonlar daxildir və ona görə ki, zülal kodlaşdırmayan lncRNT-lərdə çox eqzonlar vardır, bax Fəsil 9.) Biz əvvəlki fəsildən öyrəndik ki, insan genlərinin çoxunun intron ardıcıllıqları eqzon ardıcıllıqlarından əhəmiyyətli dərəcədə uzundur. İnsanın genom DNT-sinin təxminən 55 faizi güman olunur ki, bir və ya digər hüceyrədə pre-mRNT-lərə, pre-lncRNT-lərə və ya digər zülal kodlaşdırmayan RNT-lərə transkripsiya olunur, amma haradasa bu ardıcıllığın 95 faizi introndur və beləliklə RNT splaysinqi zamanı atılır. İnsan DNT-sinin qalan 45 faizi genlər arasındakı kodlaşdırmayan DNT-ləri və həmçinin insan xromosomlarında sentromerləri və telomerləri əmələ gətirən təkrarlanan DNT ardıcıllıqları rayonlarını təşkil edir. Nəticədə, insan DNT-sinin təxminən 97 faizə qədəri zülalı, funksional kodlaşdırmayan RNT-ləri və ya potensial lncRNT-ləri kodlaşdırmır.

Müxtəlif selektiv təzyiqlər müxtəlif orqanizmlərdə qeyri funksional DNT miqdarındakı nəzərə çarpan fərqləri ən azı qismən də olsa izah edə bilir. Məsələn, çox mikroorqanizmlər mümkün olan qida maddələrinin məhdud miqdarının olduğu eyni mühit şəraitində digər növ mikroorqanizmlərlə rəqabətdədirlər, ona görə də bu orqanizmlər üçün metabolik qənaət kritik əhəmiyyətli xüsusiyyətə malikdir. Qeyri-funksional (yəni, kodlaşdırmayan) DNT-nin sintezi zaman tələb etdiyindən qida maddələri və enerji böyük ehtimalla təkamülün gedişində *S. cerevisiae* maya göbələyi kimi tez bitən mikroorqanizmlərdə qeyri-funksional DNT-nin itirilməsi prosesi üçün selektiv təzyiq olmuşdur. Digər tərəfdən, onurğalılarda təbii seçmə onların davranışından çox asılıdır. DNT-nin sintezi üçün sərf olunan enerji əzələlərin hərəkəti və sinir sisteminin funksiyası üçün sərf olunan metabolik enerji ilə müqayisədə çox cüzidir; beləliklə də, yəqin ki, onurğalılarda qeyri-funksional DNT-nin aradan qaldırılmasında kiçik selektiv təzyiq olmuşdur. Bundan başqa, bitki və heyvanlar kimi çoxhüceyrəli orqanizmlərin əksəriyyətində hüceyrənin replikasiya vaxtı, daha sürətlə çoxalan mikroorqanizmlərlə müqayisədə daha uzundur, ona görə də sürətli hüceyrə replikasiyasını təmin etmək üçün qeyri-funksional DNT-nin aradan qaldırılmasında kiçik selektiv təzyiq olmuşdur.

Sadə Ardıcıllıqlı DNT-lərin Əksəriyyəti Spesifik Xromosom Nahiyyələrində Cəmlənmişdir

Eukariotik hüceyrələr ikiləşmiş zülal kodlaşdıran genlərdən və tandem təkrarlanan genlərdən başqa, genomda digər DNT ardıcıllıqlarının, əsasən *təkrarlanan DNT* adlanan ardıcıllıqların da çoxsaylı nüsxələrinə malikdirlər (bax Cədvəl 8-1). Təkrarlanan DNT-nin iki əsas tipinin daha az yayılanı **sadə ardıcıllıqlı DNT** və ya **satellit DNT**-dir. İnsan genomunun təxminən 6 faizini təşkil edən bu tip DNT nisbətən qısa ardıcıllıqların mükəmməl və ya təxminən mükəmməl təkrarlarından təşkil olunub. DNT təkrarlarının daha çox yayılan tipi ümumilikdə *səpələnmiş təkrarlar* (*interspersed repeates*) adlanır və daha uzun ardıcıllıqlardan ibarətdir. Bir neçə tip transpozon elementlərdən ibarət olan bu ardıcıllıqlar 8.3 bölməsində müzakirə olunur.

Sadə ardıcıllıqlı DNT-də hər bir təkrarın uzunluğu 1-dən 500 əsas cütünə qədər ola bilir. 1-13 əsas cütündən ibarət olan sadə ardıcıllıqlı DNT-lər mikrosatellitlər adlanır. Əksər mikrosatellit DNT 1-4 əsas cütü uzunluğuna malik olub, bir qayda olaraq 150 qədər və ya nisbətən az təkrarda olan tandem takrarlar şəkilində olurlar. Belə güman olunur ki, mikrosatellitlər DNT replikasiyası zamanı qız zəncirin templeyt zəncir üzərində "geriyə sürüşməsi" nəticəsində elə getmişdir ki, eyni qısa ardıcıllıq iki nüsxədə köçürülmüşdür (Şəkil 8-5).



ŞƏKİL 8-5 DNT replikasiyası zamanı yeni sintez olunan qız zəncirin geriyə sürüşməsi ilə mikrosatellit təkrarların yaranması. Əgər replikasiya zamanı (a), yaranmaqda olan yeni qız zəncir templeyt zəncirə nisbətən bir təkrar geriyə "sürüşür"sə o zaman DNT replikasiyasının davam etməsi ilə təkrarın yeni nüsxəsi qız zəncirə əlavə olunur (b). Yeni qız zəncirə əlavə olunmuş təkrarların yeni nüsxələri dupleks DNT molekulunun qız zəncirində birzəncirli ilgəklərini əmələ gətirir. Əgər bu birzəncirli ilgəklər DNT reparasiyası zülalları vasitəsi ilə növbəti DNT replikasiyasına qədərki müddətdə atılmazsa (c) o zaman ikiqat zəncirli qız DNT-sinin birinə yeni nüsxə əlavə edilmiş olur.

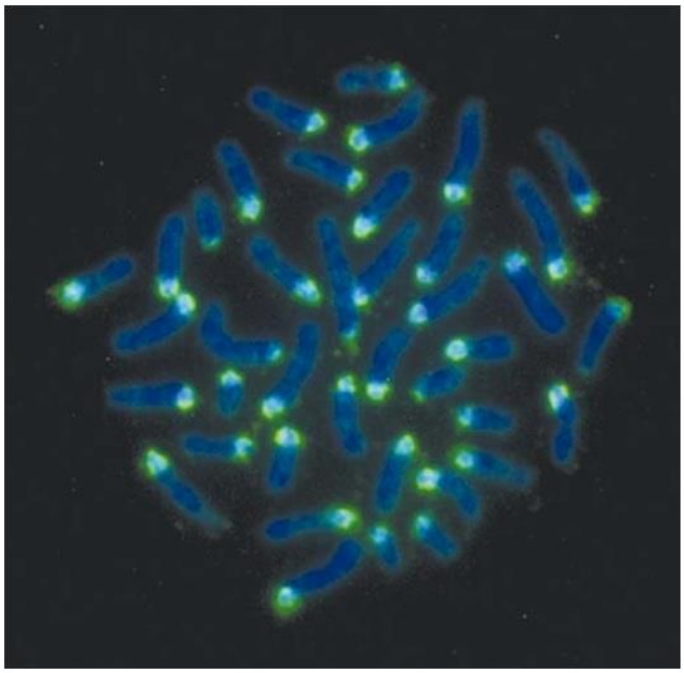
Mikrosatellitlər hərdənbir transkripsiya vahidi daxilində də rast gəlinir. Bəzi fərdlər, ümumi populyasiyada müşahidə olunanlardan fərqli olaraq xüsusi genlərin böyük miqdarda təkrarları ilə doğulurlar, çox guman ki, onların inkişaf etdiyi rüşeyim hüceyrəsində DNT replikasiyası zamanı qız zəncirin sürüşməsi nəticəsində baş verir. Aşkar olunmuşdur ki, bu cür genişlənmiş mikrosatellitlər onların meydana çıxdığı genlərdən asılı olaraq ən azı 14 müxtəlif tip sinir-əzələ xəstəliklərinin yaranmsına səbəb olur. Bəzi hallarda genişlənmiş mikrosatellitlər özlərini resessiv mutasiya kimi aparırlar, çünki onlar kodlaşdırılan genin ekspressiyasına və ya funksiyasına mane olmaqla təsir edirlər. Amma, mikrosatellit təkrarların artması ilə bağlı olan daha ümumi tip xəstəliklərdə genişlənmiş təkrarlar özünü dominant mutasiyalar kimi aparırlar. Bu xəstəliklərin, *Hantinqton xəstəliyi* kimi bəzilərində kodlaşdırıcı rayon daxilində triplet təkrarlar meydana gəlir və onlur tək bir amin turşusunun uzun polimerinin yaranmasına gətirib çıxarır, bu da uzun ömürlü neyronal hüceyrələrdə müəyyən vaxtdan sonra aqreqasiyaların yaranmasına səbəb olur və sonda neyron hüceyrələrinin normal fəaliyyətinə mane olur. Məsələn, CAG təkrarın hantinqton genin birinci eqzonunda artması uzun poliqlutamin təkrarların sintezinə səbəb olur, bu da onilliklər boyu zəhərli aqreqatlar əmələ gətirir, Hantinqton xəstəliyinin yaranmasına və neyronal hüceyrələrin ölməsinə səbəb olur.

Patogenlərlə artmış təkrarlar da həmçinin, bəzi genlərin kodlaşdırmayan rayonlarında meydana çıxır və güman olunur ki, onlar dominant mutasiya kimi fəaliyyət göstərirlər, çünki onlar əzələ və neyron hüceyrələrində mRNT dəstlərinin RNT prosessinqinə qoşularaq ekspressiya olunan genə təsir edirlər. Məsələn *I tip myotonik distrofiya* olan xəstələrdə *DMPK* genin transkripti 3′ translyasiya olunmayan rayonda 50-dən 1500 qədər CUG ardıcıllığın təkrarlarına malik olur, bu zaman normal fərdlərdə bu təkrarların sayı 5-34 olur. Təsir olunmuş (xəstə) orqanizmlərdə CUG ardıcıllığın genişlənmiş təkrarları RNT-nin çox uzun sancaq formalarının yaranmasına səbəb olur (bax Şəkil 5-9), nəticədə nüvədə RNT-birləşdirən zülallara birləşərək pre-mRNT dəstinin əzələ və neyron hüceyrələri üçün əhəmiyyətli olan normal alternativ splaysinqini aparmağa mane olur.

Sadə ardıcıllıqlı satellit DNT-lərin əksəriyyəti 14–500 əsas cütlərindən ibarət, 20–100 kə ölçülü tandem qruplar şəklində təkrarlardan təşkil olunmuşdur. Metafaza xromosomlarında in situ hibridləşmə tədqiqatları bu sadə ardıcıllıqlı DNT-lərin xüsusi xromosom rayonlarında yerləşdiyini müəyyən etdi. Bu DNT-lərin əksəriyyəti sentromer rayonuna yaxın, mitoz və meyoz zamanı mikroborucuqların birləşdiyi diskret xromosom rayonlarında yerləşir (Şəkil 8-6). Dağıdılmış *S. pombe* maya hücyrələrində aparılmış təcrübələr göstərdi ki, bu ardıcıllıqlar meyoz zamanı xromosomların düzgün seqreqasiya edərək qız hüceyrələrə keçməsində lazım olan, *sentromer heteroxromatini* adlanan xüsusiləşmiş xromatin quruluşunun formalaşması üçün tələb olunur. Sadə ardıcıllıqlı DNT həmçinin uzun tandem (dəstə-dəstə) qruplar şəklində xromosomun uc zonalarında, onun uclarını təşkil edən və bu fəsilin sonrakı bölmələrində müzakirə olunduğu kimi, xromosom uclarının digər xromosom DNT-si ucları ilə birləşməsinin qarşısını alan telomerlərdə də tapılmışdır.

DNT Finqerprintinqi Sadə Ardıcıllıqlı DNT-lərin Uzunluğundakı Fərqlərdən Asılıdır

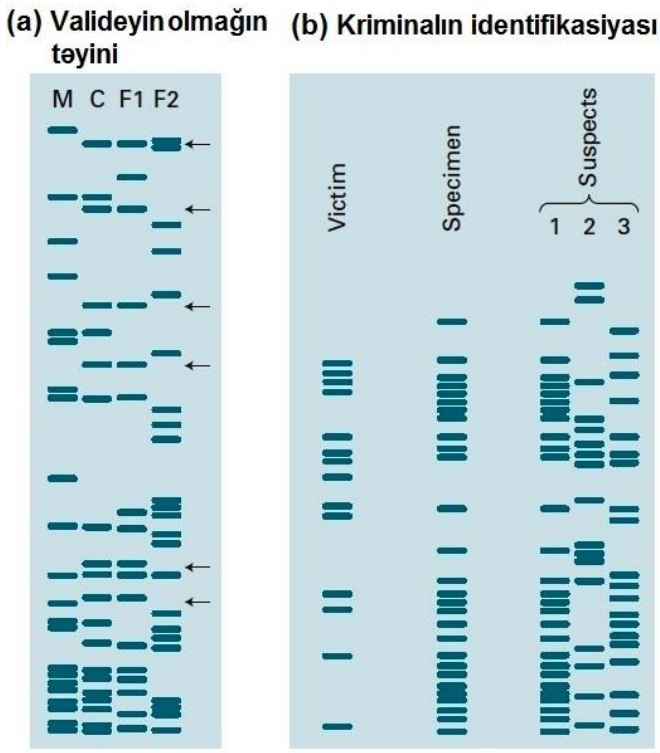
Növ daxilində sadə ardıcıllıqlı DNT-nin tandem (dəstə-dəstə) düzülüşünü təşkil edən təkrarlanan vahidlərin nukleotid ardıcıllığı fərdlər arasında yüksək konservativliyə malikdir. Bunun əksinə, təkrarların *sayı* və beləliklə də eyni təkrarlanan vahidə malik olan sadə ardıcıllıqlı tandem düzülüşün uzunluğu fərdlər arasında kifayət qədər dəyişkəndir. Təkrarların uzunluğundakı bu cür fərqlər güman olunur ki, meyoz dövründə sadə ardıcıllıqlı DNT-nin rayonları daxilindəki qeyri-bərabər krossinqoverin nəticəsində yaranmışdır. Bu cür qeyri-bərabər krossinqoverin nəticəsində bəzi tandem düzülüşün uzunluğu hər bir fərd üçün unikaldır.



EKSPERIMENTAL ŞƏKIL 8-6 Sadə ardıcıllıqlı DNT-nin siçanın xromosomlarının sentromer hissəsində tapılması. Siçan hüceyrələrindən təmizlənib ayrılmiş sadə ardıcıllıqlı DNT-nin sürəti *E.coli* DNT polimeraza I-dən və fluoressent nişanlanmış dNTP-lərdən istifadə etməklə in vitro köçürülmüş və siçanın sadə ardıcıllıqlı DNT-si üçün fluoressent nişanlanmış DNT problar hazırlanmışdır. Kulturada yetişdirilmiş siçan hüceyrələrinin xromosomları fiksə olunmuş və mikroskop əşya şüşələri üzərində denaturasiya olunmuşdur, sonra isə xromosom DNT-si nişanlanmış problarla in situ hibridləşdirilmişdir (açıq mavi). Xromosomların tam uzunluğunu vizuallaşdırmaq üçün slaydlar DNT birləşdirən boya DAPI ilə rənglənmişdir (tünd mavi). Fluoressent mikroskopiya göstərir ki, sadə ardıcıllıqlı problar ilkin olaraq siçan xromosomunun bir ucunda olan telomer zonasına (yəni, sentromerlərin bir uca yaxın yerləşdiyi xromosomlar) hibridləşir. [Nəzakətlə Sabinə Mal, PhD, Manitoba Hüceyrə biologiyası İnstitutu, Kanada, verilmişdir.]

İnsanda və başqa məməlilərdə bəzi sadə ardıcıllıqlı DNT nisbətən qısa 1 – 1.5 kə rayonda yerləşir və hər birinin uzunluğu ~14-100 əsas cütündən ibarət olan 20-50 təkrarlanan vahidləri əmələ gətirirlər. Bu rayonlar 1-13 əsas cütündən ibarət olan mikrosatellitlədən fərqli olaraq *minisatellitlər* adlandırılır. Hətta

ayrı-ayrı fərdlərdən alınmış müxtəlif minisatellitlərin ümumi uzunluğundakı belə kiçik fərqlər Sauzern blottinqlə aşkar oluna bilir (bax Şəkil 6-24). Bu metod ilk dəfə *DNT polimorfizminin* təyini (eyni növün fərdlərinin ardıcıllıqları arasındakı fərq) zamanı *DNT finqerprintinqin* aşkar olunmasında istifadə olunmuşdur (Şəkil 8-7). Hal-hazırda kriminal genetik yoxlamalar zamanı daha həssas metoddan – polimeraza zəncirvari reaksiyadan (PZR, Şəkil 6-18) istifadə olunr. Adətən bu gün dörd əsasın 30-50 nüsxədə tandem təkrarlardan ibarət olan mikrosatellit DNT ardıcıllıqları analiz olunur. Genomun spesifik bölgəsində təkrarların dəqiq sayı fərdin iki homoloji xromosomları arasında (irsən biri anadan biri də atadan alınır) və müxtəlif erkəklərdə Y xromosomlar arasında fərqlənirlər. Bu qısa tandem təkrarların 13-ünə cinahdan olan və Y xromosomun qısa tandem təkrarını birləşdirən unikal ardıcıllığa hibridləşən



ŞƏKİL 8-7 DNT finqerprintinqi yolu ilə fərdlərin fərqləndirilməsi. (a) Atalığın bu analizlərində bir sıra minisatellit təkrarların uzunluğu genom DNT-inin restriksiya fermenti ilə doğranmış fraqmentlərində, ardıcıllığı bir neçə minisatellitin ardıcıllığı ilə eyni olan problarla hibridləşdirməklə Sauzern blottinq yolu ilə təyin edilmişdir. Bu metod hər bir fərd üçün "DNT finqerprint" adlanan hiperdəyişkən çoxbəndli profili yaratdı. M xətti ana DNT-sini istifadə etməklə, C uşağın DNT-sini istifadə etməklə, F1 və F2 isə iki potensial atadan alınmış DNT-ni istifadə etməklə restriksiya fraqmenti bəndlərinin profilini göstərir. Uşaq ya anadan ya da F1-dən alınmış minisatellit təkrarlanan uzunluqlara malikdir və göstərir ki, ata F1-dir. Ox işarələri F2-nin deyil, uşağın DNT-sində tapılmış F1-in restriksiya fraqmentlərini göstərir. (b) Zorlanmağa məruz qalmış qurbanın nümunəsindən ayrılan və şübhəli bilinən üç kriminal kişinin nümunələrindən alınan bu "DNT finqerprintində" açıq şəkildə görünür ki, qurbandan götürülmüş nümunədəki minisatellit təkrarların uzunluqları şübhəli **şəxs 1**-inkinə uyğun gəlir. Şübhəli şəxsin DNT-sinin zorlanmış qurbanın DNT-si ilə çirklənmədiyinə əmin olmaq üçün zorlanmaya məruz qalmış qurbanın DNT-si analiz olunmuşdur.

cüt PCR praymerlərinin qatışığı insandan alınan DNT nümunəsinin amplifikasiyasında istifadə olunur. Nəticədə alınmış PZR məhsulun qatışığının uzunluğu eyni olan bir yumurta əkizləri istisna olmaqla insan populyasiyasında hər bir fərd üçün unikaldır. PZR metodun istifadə olunması DNT-nin qısa müddətdə ən kiçik miqdarının analizləri üçün imkan verir, fərdlər daha dəqiqliklə fərqləndirilə bilir və bu metod ənənəvi finqerprintinqdən daha rahat və inandırıcıdır.

Təsnifləşdirilməmiş Genlərarası DNT Genomun Kifayət Qədər Böyük Hissəsini Tutur

İnsan DNT-sinin təxminən 45 faizi transkripsiya vahidləri arasında yerləşir. Bu ardıcıllıqların çoxu genomda hər hansı başqa yerdə təkrarlanmır. 50-200 əsas cütündən ibarət olan və uzaq (kənar) promotordan transkripsiya prosesini tənzimləyən enhanserlər genlərarası DNT-nin uzun hissələrində və eləcə də intronlarda meydana gəlir. Bu enhanserlər (Fəsil 9-da müzakirə olunur) çox zaman təkamül prosesində qorunub saxlanılır, amma qonşuluqdakı genlərarası sahə saxlanılmır. Başqa konservativ genlərarası rayonlar ola bilsin ki, hələ tam anlaşılmayan əhəmiyyətli funksiyanı yerinə yetirirlər. Məsələn, 8.6 bölməsində müzakirə olunduğu kimi, onlar xromosomun quruluşunda əhəmiyyətli rol oynayırlar.

8.2 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Genlərin Xromosomlarda Təşkili və Kodlaşdırmayan DNT

- Çox az qeyri-funksional ardıcıllığa malik olan, prokariotların və ibtidai eukariotların əksəriyyətinin genomunda kodlaşdırıcı rayonlar sıx şəkildə genom DNT-si boyunca düzülmüşlər.
- Bunun əksinə, çoxhüceyrəli heyvanların və ali bitkilərin genomu funksional RNT-ləri kodlaşdırmayan və ya istənilən tənzimləyici funksiyanı daşımayan çoxsaylı ardıcıllıqlara malikdirlər. Bu qeyri-funksional DNT-lərin çoxu təkrarlanan ardıcıllıqlardan ibarətdirlər. İnsanlarda ümumi DNT-nin yalnız 2.9 faizə yaxını (eqzonlar) zülal və ya funksional RNT-ləri kodlaşdırır.
- Fərqli növlərin genomlarında qeyri-funksional DNT miqdarının dəyişməsi, heyvanın və ya bitkinin haploid xromosomlarında DNT-nin miqdarı ilə onların filogenetik mürəkkəbliyi arasında qarşılıqlı əlaqənin olmamasında çox mühüm rol oynayır.
- Uzun tandem düzülüşlər şəkilində təkrarlanan qısa ardıcıllıqlardan təşkil olunmuş sadə ardıcıllıqlı DNT xromosomların sentromerlərində, telomerlərində daha böyük üstünlüklə düzülürlər.
- Xüsusi sadə ardıcıllıqlı tandem düzülüşün uzunluğu demək olar ki, meyoz zamanı baş verən qeyri-bərabər krossinqoverə görə növün fərdləri arasında kifayət qədər fərqlənirlər. Bəzi sadə ardıcıllıqlı tandem düzülüşlərin uzunluqları arasındakı fərqlər DNT finqerprintinqinin əsasını təşkil edir (bax Şəkil 8-7).

8.3 Transpozon (Mobil) DNT Elementləri

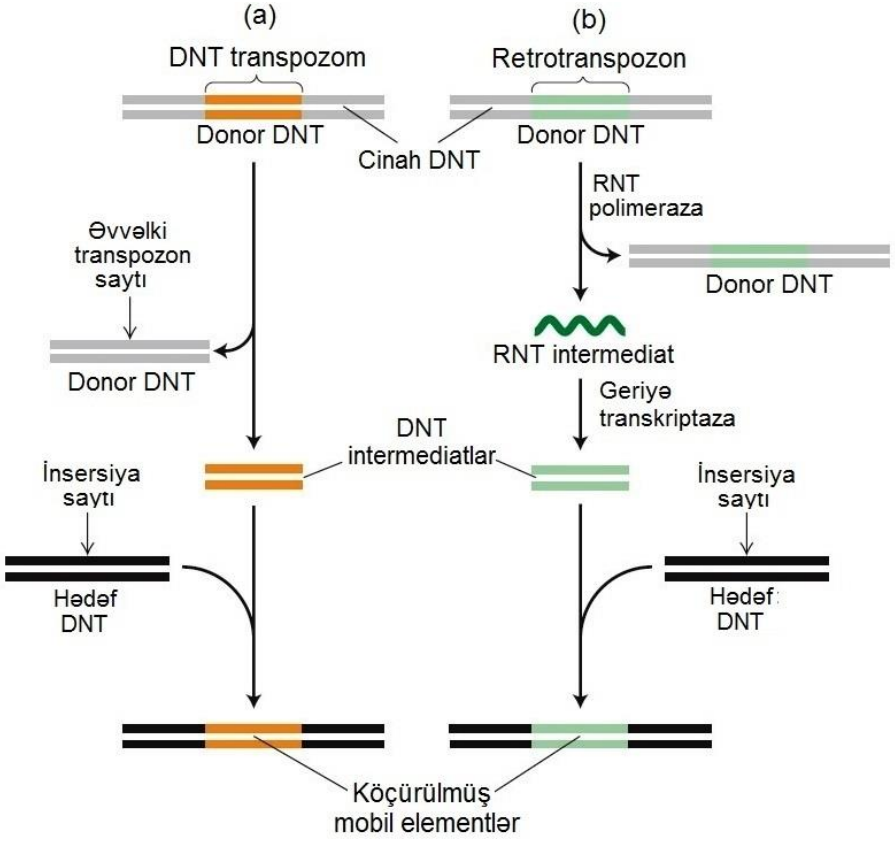
Eukariot genomlarında təkrarlanan DNT-nin ikinci tipi, qarışıq (səpələnmiş) təkrarlar nisbətən kiçik sayda ardıcıllıq ailəsinin çox böyük miqdarda təkrarlanan nüsxələrindən ibarətdir (bax Cədvəl 8-1). *Orta təkrarlanan DNT* (*moderately repeated DNA*) və ya *aralıq təkrarlanan DNT* (*intermediate repeat DNA*) kimi də məlum olan bu ardıcıllıqlar məməlilərin bütün genomu boyu səpilmişdir və məməlilərdə ümumi DNT-nin 25-50 faizini təşkil edir (insan DNT-nin ~45 faizini təşkil edir).

Aralıq səpilmiş təkrarlar genomda unikal "hərəkət etmək" (yer dəyişmək) qabliyyətinə malik olduğundan onları ümumilikdə *yerini dəyişən* (*transpozon) DNT elementləri* və ya *mobil DNT elementləri* kimi adlandırılır (biz bu terminləri qarşılıqlı əvəzolunan kimi istifadə edirik). Baxmayaraq ki, yerini dəyişən DNT elementləri ilkin olaraq eukariotlarda aşkar olunmuşdur, onlar, hərçənd bir az kiçik tezliklərlə, prokariotlarda da tapılmışdır. Bu ardıcıllıqların genomda nüsxəsinin çıxarılması və yeni saytlara keçirilməsi prosesi **transpozisiya** adlanır. Yerini dəyişən DNT elementləri əhəmiyyətli molekulyar simbiotlardır və çox hallarda sahib orqanizmlərin biologiyasında spesifik funksiyaya malik deyillər, amma onlar yalnız özlərini qoruyub saxlamaq üçün mövcud olurlar. Ona görə də Fransis Krik onları "eqoist DNT" ("selfish DNA") adlandırmışdır.

Transpozisiya rüşeym hüceyrələrində baş verərkən köçürülmüş ardıcıllıqlar öz yeni saytlarında sonrakı nəsilə ötürülürlər. Bu yolla mobil elementlər tədricən artaraq təkamülün gedişində eukariotların genomunda toplanmışlar. Mobil elementlər eukariot genomundan çox zəif uzaqlaşdırıldığından, indi onlar çox eukariotların genomunun əhəmiyyətli dərəcədə böyük hissəsini təşkil edirlər.

Mobil elementlər bizim genomumuzda yalnız DNT-nin əsas mənbəyi deyil, o eyni zamanda, meyoz rekombinasiyadan başqa, təkamül prosesində xromosom DNT-nin yenidən təşkilini (qurulmasını) həyata keçirmək kimi ikinci bir mexanizmi də təmin edir (bax Şəkil 8-2). Bunun bir səbəbi ondan ibarətdir ki, xüsusi mobil elementin transpozisiyası zamanı, ona yaxın olan DNT elementi də mobilizasiya olunur (bax aşağıda Şəkil 8-19). Transpozisiya seyrək hallarda baş verir: insanda hər səkkiz fərddə bir yeni rüşeym-xəttində bir transpozisiya baş verir. Bizim DNT-nin 97 faizi kodlaşdırmayan DNT olduğundan transpozisiyanın çoxu zərərli təsirə malik olmur. Lakin zaman keçdikcə onlar çoxsaylı eqzonlara malik olan genlərin və ekspressiyası spesifik hüceyrələrdə və ya inkişafın müəyyən mərhələsində məhdud olan genlərin təkamülündə əhəmiyyətli yeri tutdular. Başqa sözlə, baxmayaraq ki, yerini dəyişən (mobil) DNT elementləri böyük ehtimalla hüceyrə simbiotları kimi yaranmışlar, onlar çoxhüceyrəli mürəkkəb orqanizmlərin təkamülündə əhəmiyyətli funksiyaya malikdirlər.

Transpozisiya somatik hüceyrələrdə də baş verə bilər, bu zaman keçirilmiş ardıcıllıq yalnız bu hüceyrədən törənmiş qız hüceyrəyə ötürülə bilir. Çox seyrək hallarda belə somatik hüceyrə transpozisiyası somatik hüceyrənin zərərli fenotipik təsirlərinə malik olan mutasiyaya səbəb olur, məsələn şiş supressor genin fəalsızlaşması kimi (bax Fəsil 24). Bu bölmədə biz əvvəlcə transpozon DNT elementlərinin əsas tiplərinin quruluşunu və transpozisiya mexanizmini təsvir edirik, sonra isə onların təkamüldə güman olunan rolunu izah edirik.



ŞƏKİL 8-8 Mobil elementlərin iki əsas sinifi. (a) Eukariotik DNT transpozonlar (narıncı) donor saytından kəsilərək DNT intermediatla keçirlər. (b) Retrotranspozonlar (yaşıl) əvvəlcə RNT molekuluna transkripsiya olunurlar və sonra geriyə-transkripsiya yolu ilə iki-zəncirli DNT molekuluna çevrilirlər. Hər iki halda ikizəncirli DNT intermediat DNT-nin hədəf saytına inteqrasiya edir, köçürməni başa çatdırır. Beləliklə, DNT transpozonları "kəs-və-yerləşdir" mexanizmi ilə köçürülüdüyü halda, retrotranspozonlar "surətini çıxar-və-yerləşdir" mexanizmi ilə keçirlər.

Mobil Elementlərin Keçirilməsinə DNT və ya RNT Aralıq Məhsulları Daxildirlər

Barbara MkKlintok 1940-cı illərdə qarğıdalı üzərində klassik genetik təcrübələr edərkən ilk dəfə mobil elementləri aşkar etdi. O, qarğıdalı dənələrinin fenotipini dəyişərək genlərə daxil olan və çıxan bilən genetik xüsusiyyətləri xarakterizə etdi. Onun nəzəriyyələri bakteriyalarda xüsusi DNT ardıcıllığı kimi xarakterizə olunan oxşar mobil elementlər aşkar olunana qədər və transpozisiyaların molekulyar əsasları açılana qədər çox mübahisəli oldu.

Mobil elementlər üzrə tədqiqatlar irəlilədikcə onların iki kateqoriyaya ayrıldığı aşkar olundu: (1) birbaşa DNT kimi keçənlər və (2) mobil elementlərdən RNT polimeraza vasitəsi ilə transkripsiya olunaraq RNT intermediatlar kimi və sonra da geriyə-transkriptaza vasitəsi ilə ikizəncirli DNT-yə çevrilməklə keçənlər (Şəkil 8-8). Birbaşa DNT kimi transpozisiya olunan mobil elementlər əsasən **DNT transpozonlar** və ya sadəcə olaraq **transpozonlar** adlanır. Eukariotik DNT transpozonlar bir saytı kəsərək özlərini buraxırlar və digər sayta keçməklə genomda yerini dəyişirlər. Genomda yeni sayta RNT intermediat vasitəsilə transpozisiya olunan mobil elementlər **retrotranspozonlar** adlanır. Retrotranspozonlar özlərinin RNT nüsxəsini yaradırlar və bu yeni nüsxəni genomda digər sayta keçirirlər, bu zaman orjinal öz yerində də qalır. Retrotranspozonların keçməsi retrovirusların yoluxdurma mexanizminə anolojidir (Şəkil 5-49). Həqiqətən də, reroviruslara retrotranspozonlar kimi baxıla bilər. Belə ki, törənmiş gen virus örtüyünü kodlaşdırır və beləliklə onların hüceyrələr arasında birindən digərinə keçməsinə (transpozisiyasına) imkan verir. Retrotranspozonlar həmçinin onların xüsusi transpozisiya etmə mexanizminə əsasən təsnifləşdirilə bilərlər. Ümumiləşdirməklə, DNT transpozonlar "kəs-və-yerləşdir" mexanizmi transpozisiya olunurlar, amma retrotranspozonlar RNT intermediat məhsulu kimi "surətini çıxar-və-yerləşdir" mexanizmi ilə keçirlər.

DNT Transpozonlar Eukariotlarda və Prokariotlarda Mövcuddurlar

Bakteriyalarda mobil elementlərin əksəriyyəti birbaşa DNT kimi transpozisiya olunurlar. Əksinə, eukariotlarda mobil elementlərin əksəriyyəti retrotranspozonlardır, amma eukariotik DNT transpozonlar da mövcuddur. Həqiqətən də Barbara MkKlintok tərəfindən ilk tapılan mobil element DNT transpozon olmuşdur.

Bakterial insersiya ardıcıllıqları Mobil elementlərin ilk molekulyar anlayışları təxminən ~1-2 kə uzunluqda DNT ardıcıllıqlarının spontan insersiya yolu ilə genin ortasına keçirilməsilə əmələ gələn müəyyən *E.coli* mutantlarının tədqiqatlarından yaranmışdır. Daxil olmuş bu DNT hissəsi *insersiya ardıcıllığı* və ya *IS elementlər* adlandırılmışdır. Bu vaxta qədər *E.coli*-də və başqa bakteriyalarda 20-dən artıq müxtəlif IS element tapılmışdır.

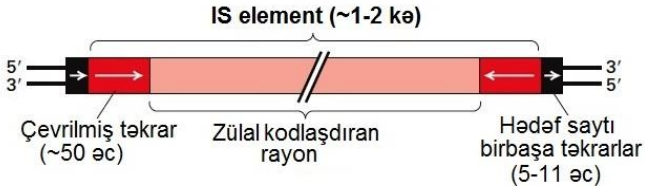
IS elementin transpozisiyası çox nadir hallarda baş verir, xüsusi bir IS elementdən asılı olaraq hər hüceyrə generasiyasında 10^5-10^7 hüceyrədən yalnız birində meydana gəlir. Tez-tez hallarda, transpozisiya əhəmiyyətli genləri fəalsızlaşdırır, sahib hüceyrəni və onun daşıdığı IS elementi öldürür. Ona görə də, transpozisiyanın yüksək sürəti demək olar ki, sahib orqanizmə onun sağ qalması üçün həddən artıq yüksək olan mutasiya olunma dərəcəsi ilə nəticələnər. Amma, IS elemenrlər bu və ya digər dərəcədə təsadüfi transpozisiya olunduğundan, transpozisiya olunmuş bəzi ardıcıllıqlar genomun qeyri-əhəmiyyətli rayonuna keçirlər (məsələn, genlər arasındakı rayona) və hüceyrəyə sağ qalmağa (yaşamağa) imkan verirlər. Transpozisiyanın çox aşağı dərəcəsində sahib orqanizmlərin əksəriyyəti sağ qalır və ona görə də simbiotik IS element ilə çoxalırlar. IS elementlər həmçinin plazmidlərə və lizogen viruslara keçirilə və beləliklə başqa hüceyrələrə daşına bilirlər. Bu yolla, IS elementlər yetkin hüceyrələrin xromosomlarına transpozisiya olunurlar.

IS elementlərin əsas quruluşu Şəkil 8-9-dakı diaqramda verilmişdir. 10-40 əsas cütün çevrilmiş təkrarı IS elementin hər iki ucunda dəyişilməz şəkildə mövcud olur. *Çevrilmiş təkrarda* (*inverted repeat*) hər bir zəncirdəki 5′→3′ ardıcıllıq başqa zəncirdə də təkrarlanır, məsələn

5'**CAG**C----------GCTC3'
3'CTCG----------C**GAG**5'

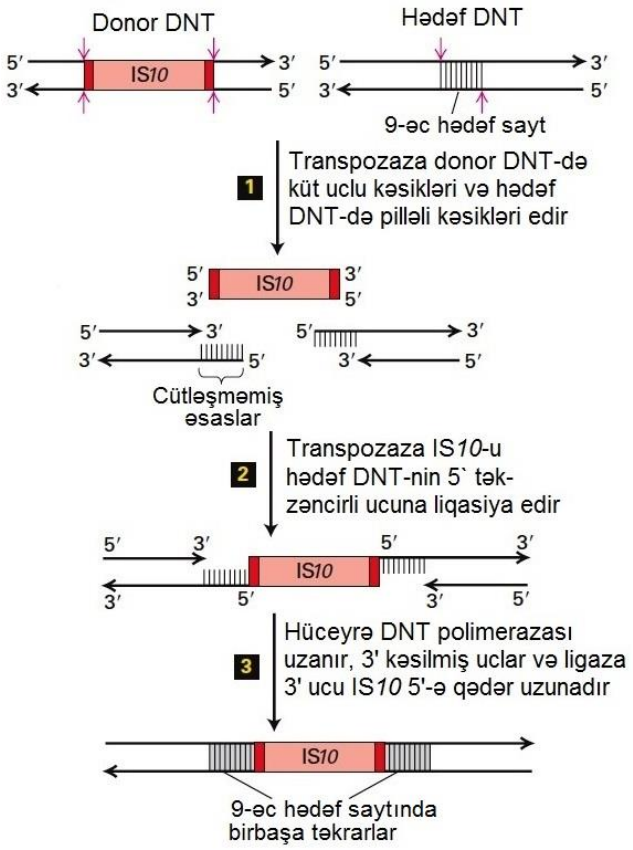
kimi.

Çevrilmiş təkrarlar arasında IS elementin yeni sayta transpozisiya olunması üçün tələb olunan ferment-*transpozaza*nı kodlaşdıran rayon yerləşir. Transpozaza transpozisiyanın tezliyinin çox aşağı olması ilə əlaqədar olaraq çox seyrək hallarda ekspressiya olunur. IS elementin əsas əlaməti (təyinedicisi) IS elementdən asılı olaraq 5-11 əsas cütündən ibarət olan, insersiya olunmuş elementin dərhal hər iki ucuna bitişik olan, qısa *birbaşa-təkrarlanan ardıcıllığın* olmasıdır. Birbaşa təkrarın *uzunluğu* hər bir IS element üçün xarakterikdir, amma onun *ardıcıllığı* IS elementin xüsusi nüsxəsinin keçirildiyi hədəf saytdan asılıdır. IS ardıcıllığa malik olan mutasiya olunmuş genin ardıcıllığı təbii formalı genin ardıcıllığı ilə müqayisə olunanda qısa birbaşa-təkrarlanan ardıcıllığın təbii formalı gendə yalnız bir nüsxəsi tapılmışdır. IS elementə bitişik ikinci birbaşa təkrarı yaratmaq üçün insersiya prosesi zamanı bu hədəf-sayt ardıcıllığının ikiləşməsi (duplikasiyası) baş verir.



ŞƏKİL 8-9 Bakterial IS elementlərin əsas quruluşu. IS elementin transpozisiya üçün tələb olunan bir və ya iki fermenti kodlaşdıran nisbətən böyük mərkəzi rayonu hər cinahında geriyə təkrarlarla birləşir. Geriyə təkrarların ardıcıllıqları demək olar ki, çox oxşardır, amma əks istiqamətlərdə yönəlmişlər. Ardıcıllıq xüsusi bir IS elementə xarakterikdir. Qısa birbaşa 5′ və 3′ (*geriyə ardıcıllığın* əksinə olduğu kimi) təkrarlar insersiya elementi ilə transpozisiya olunmurlar, əksinə onlar insersiya-saytı ardıcıllıqlarıdırlar və mobil elementin insersiyası zamanı hər ucunda bir nüsxə olmaqla duplikasiya olunurlar. Birbaşa təkrarların uzunluğu verilmiş IS element üçün sabitdir, amma onların ardıcıllığı insersiya saytından asılıdır və ona görə də IS elementin hər bir transpozisiyası ilə dəyişilir. Oxlar ardıcıllığın istiqamətini göstərir. Bu diqaramdakı rayonlar miqyasda deyil; kodlaşdırıcı rayon IS elementin əsas uzunluğunu təşkil edir.

Şəkil 8-10-da verildiyi kimi, IS elementin transpozisiyası "kəs-və-yerləşdir" mexanizmi ilə baş verir. Transpozaza fermenti bu prosesdə üç funksiyanı həyata keçirir: (1) donor DNT-dən IS elementi dəqiq kəsir, (2) hədəf DNT-də qısa ardıcıllıqda pilləli kəsiklər edir və (3) IS elementin 3′- sonluğunu kəsilmiş donor DNT-nin 5′ sonluğuna liqasiya edir. Nəhayət, sahib-hüceyrənin DNT-polimerazası IS elementin yandan birləşdiyi birbaşa qısa təkrarları yaradaraq bir zəncirli boşluqları doldurur və DNT liqaza sərbəst ucluqları birləşdirir.



ŞƏKIL 8-10 Bakterial insersiya ardıcıllığının keçirilməsinin modeli. Pillə 1: IS elementdə (bu nümunədə *IS10*) kodlaşdırılan transpozaza donor DNT-nin hər iki zəncirini çevrilmiş təkrarın ardınca kəsərək (tünd qırmızı) *IS10* elementi çıxarır. Böyük nizamsız hədəf saytda transpozaza hədəf DNT-də pilləli kəsiklər edir. *IS10* olanda iki kəsik bir-birindən 9-əc məsafədə olur. Pillə 2: Kəsilib çıxarılmış IS elementin 3′ sonluğunun hədəf DNT-də pilləli saytlara liqasiyası da transpozaza ilə kataliz olunur. Pillə 3: Əmələ gəlmiş intermediatda yaranan tək zəncirli DNT-nin 9-əc boşluqları hüceyrənin DNT polimerazası vasitəsi ilə doldurulur, nəhayət, sonda hüceyrənin DNT liqazası genişləndirilmiş hədəf DNT zəncirlərinin 3′ sonluqları ilə IS*10* zəncirlərin 5′ sonluqları arasında 5′→3′ fosfodiefir əlaqələrini yaradır. Bu proses daxil edilmiş IS elementin hər bir tərəfində hədəf-sayt ardıcıllığında duplikasiyanın (ikiləşmənin) baş verməsi ilə nəticələnir. Qeyd etmək lazımdır ki, hədəf saytın uzunluğu və IS*10* uzunluğu ölçülməyəndir. Bax H.W. Benjamin and N. Kieckner, 1989, *Cell***59**:373; və 1992, *P.N.A.S. USA***89**:4648.

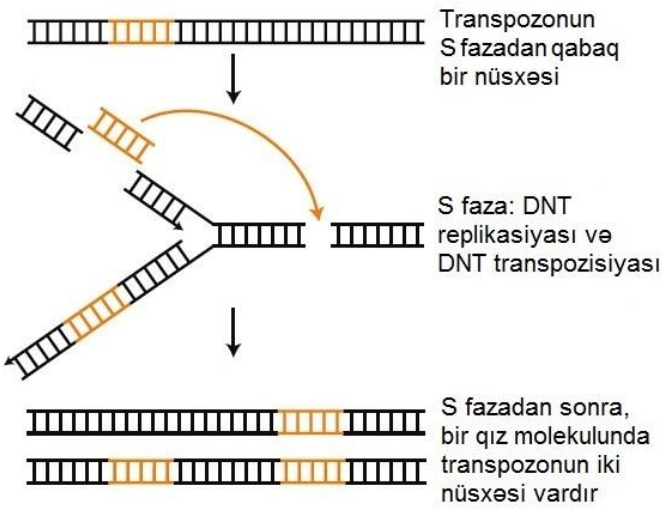
Eukariotik DNT transpozonlar MakKlintokun mobil elementlərin orjinal kəşfi qarğıdalıda qarğıdalı dənələrinə bənövşəyi rəng verən antosianinin sintezi üçün tələb olunan fermentlərin istehsalına təsir edən baş vermiş spontan mutasiyalar üzərində aparılan müşahidələr nəticəsində meydana gəlmişdir. Mutant dənlər ağ olurlar, təbii formalı dənlər isə bənövşəyi olurlar. Bu mutasiyaların bir sinifi yüksək tezlikdə geriyə dönəbilən olduğu halda, ikinci sinif mutasiyalar geriyə dönən deyillər, onlar yalnız birinci sinif mutasiyalar mövcud olduğu zaman əmələ gələndə geriyə dönən olurlar. MakKlintok birinci sinif mutasiyalar üçün cavabdeh olan agenti *aktivator* (*Ac*) *element* adlandırdı və ikinci sinif mutasiyalar üçün cavabdeh olan agentləri isə *dissosasiya* (*Ds*) *elementləri* adlandırdı, çünki onlar xromosom qırılmaları ilə əlaqədə olmağa da meyilli idilər.

MakKlintokun ilk kəşflərindən çox-çox illər sonra, klonlaşdırma və ardıcıllığın oxunması aşkar etdi ki, Ac elementlər bakteriyalardakı IS elementlərə ekvivalentdirlər. IS element kimi onlar da, terminal təkrarları tanıyaraq DNTdə yeni sayta keçirilməni kataliz edən transpozaz fermentinin kodlaşdırıcı rayonuna cinah olan (yandan irləşən) çevrilmiş terminal təkrarlanan ardıcıllığa malikdirlər. Ds elementlər Ac elementin silinmiş formasıdır, bu zaman transpozazanı kodlaşdıran ardıcıllığın bir hissəsi itirilmiş olur. Funksional transpozazanı kodlaşdırmadığından Ds element özü keçə bilmir. Amma, Ac elementləri daşıyan və beləliklə funksional transpozazanı ekspressiya edən bitkilərdə Ds elementlər köçürülə bilir, çünki onlar transpozaza tərəfindən tanına bilən çevrilmiş terminal təkrarlara malikdirlər.

MakKlintokun qarğıdalıda mobil elementlər üzrə apardığı ilkin tədqiqatlarından bəri transpozonlar başqa eukariotlarda da aşkar olunmuşdur. Məsələn, *Drosophila*-da müşahidə olunan spontan mutasiyaların təxminən yarısı mobil elementlərin keçirilməsi ilə baş verir. Hərçənd ki, *Drosophila*-da olan mobil elementlərin əksəriyyəti retrotranspozonlar kimi fəaliyyət göstərirlər, ən azı bir mobil element - P-element bakterial insersiya ardıcıllığının istifadə olunan mexanizminə bənzər yolla keçərək DNT transpozonu kimi fəaliyyət göstərir. Transgen *Drosophila*-nı yaratmaq üçün müasir metodlar, Fəsil 6-da müzakirə olunduğu kimi, P-element transpozazanın yüksək səviyyədə ekspressiyasınıdan və transpozisiya üçün P-element çevrilmiş terminal təkrarların hədəf kimi istifadə olunmasından asılıdır (bax Şəkil 6-20).

Əgər DNT-nin kəs-və-yerləşdir mexanizmi ilə transpozisiyası hüceyrə tsiklinin S fazasında DNT sintezi zamanı (bax Şəkil 1-21) baş verirsə, o transpozonların nüsxələrinin sayının artması ilə nəticələnə bilər. Nüsxələrin sayının belə artması o zaman baş verir ki, donor DNT replikasiya olunmuş xromosom rayonunda iki qız DNT molekullarının birindəndir, hədəf DNT isə hələ replikasiya olunmamış xromosom rayonundadır. DNT replikasiyası S fazanın sonunda tamamlananda hədəf DNT-də özünün yeni lokalizasiyasında replikasiya olunur və bu transpozonların hüceyrədə ümumi sayının xalis artımına səbəb olur (Şəkil 8-11). Bu cür keçirilmə (transpozisiya) meyozdan öncəki S fazada baş verərkən əmələ gəlmiş dörd rüşeym hüceyrədən biri transpozonun əlavə nüsxəsinə malik olur. Təkamülün gedişi zamanı bu prosesin təkrarlanması bəzi orqanizmlərin genomunda böyük miqdarda DNT transpozonların toplanması ilə nəticələnmişdir. İnsanın DNT-si 300000 nüsxədə tam uzunluqlu və silinmiş DNT transpozonlara malikdir ki, bu da insan genomunun təxminən 3 faizə qədərini təşkil edir. Bizim tezliklə görəcəyimiz kimi, bu

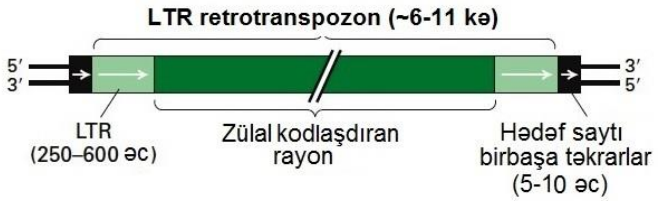
mexanizm transpozonun özü ilə yanaşı genom DNT-nin də köçürülməsinə (transpozisiyasına) səbəb ola bilər.



ŞƏKİL 8-11 DNT-transpozon nüsxələrinin sayının artırılması mexanizmi. Əgər kəs-və-yerləşdir mexanizmi ilə keçirilən DNT transpozon (bax Şəkil 8-10) S fazasında xromosomun replikasiya olunmuş rayonundan xromosomun hələ replikasiya olunmayan rayonuna keçirilirsə, sonra xromosomun replikasiyası tamamlanarkən iki qız xromosomdan biri transpozonun bir nüsxəsinin xalis artımına malik olacaq.

LTR Retrotranspozonlar Özlərini Hüceyrədaxili Retroviruslar Kimi Aparırlar

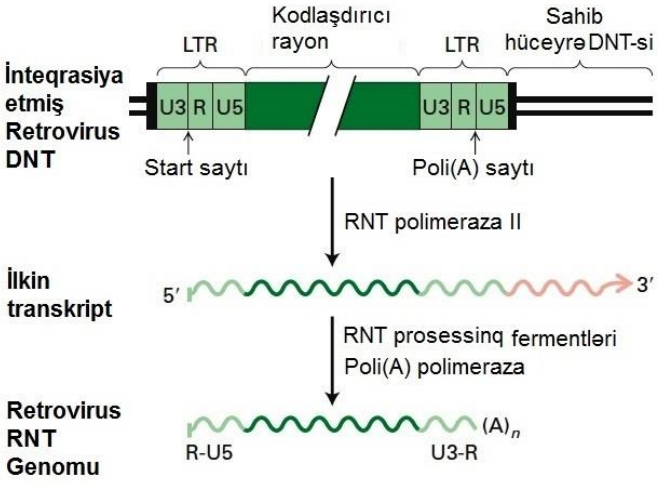
Mayadan insana qədər bütün öyrənilmiş eukariotların genomu retrotranspozonlara, geriyə transkriptazadan istifadə edərək RNT intermediat vasitəsi ilə yerini dəyişən mobil elementlərə malikdirlər (bax Şəkil 8-8b). Bu mobil elementlər iki əsas kateqoriyaya bölünürlər: **uzun terminal təkrarlara** (**long terminal repeates – LTRs**) malik olanlar və olmayanlar.



ŞƏKIL 8-12 Eukariotik LTR retrotranspozonların əsas quruluşu. Mərkəzi zülal-kodlaşdıran rayon cinahdan iki uzun terminal təkrarla (LTR-lər) birləşir, bunlar element spesifik birbaşa təkrarlardır. Başqa mobil elementlər kimi inteqrasiya olunmuş retrotranspozonlar hər bir sonluqda qısa hədəf saytın birbaşa təkrarlarına malikdirkər. Qeyd etmək lazımdır ki, müxtəlif rayonlar miqyasda çəkilməyib. Zülal kodlaşdıran rayon retrotranspozonların 80 faizini və ya daha çox hissəsini təşkil edir və geriyə transkriptazanı, inteqrazanı və digər retrovirus zülallarını kodlaşdırır.

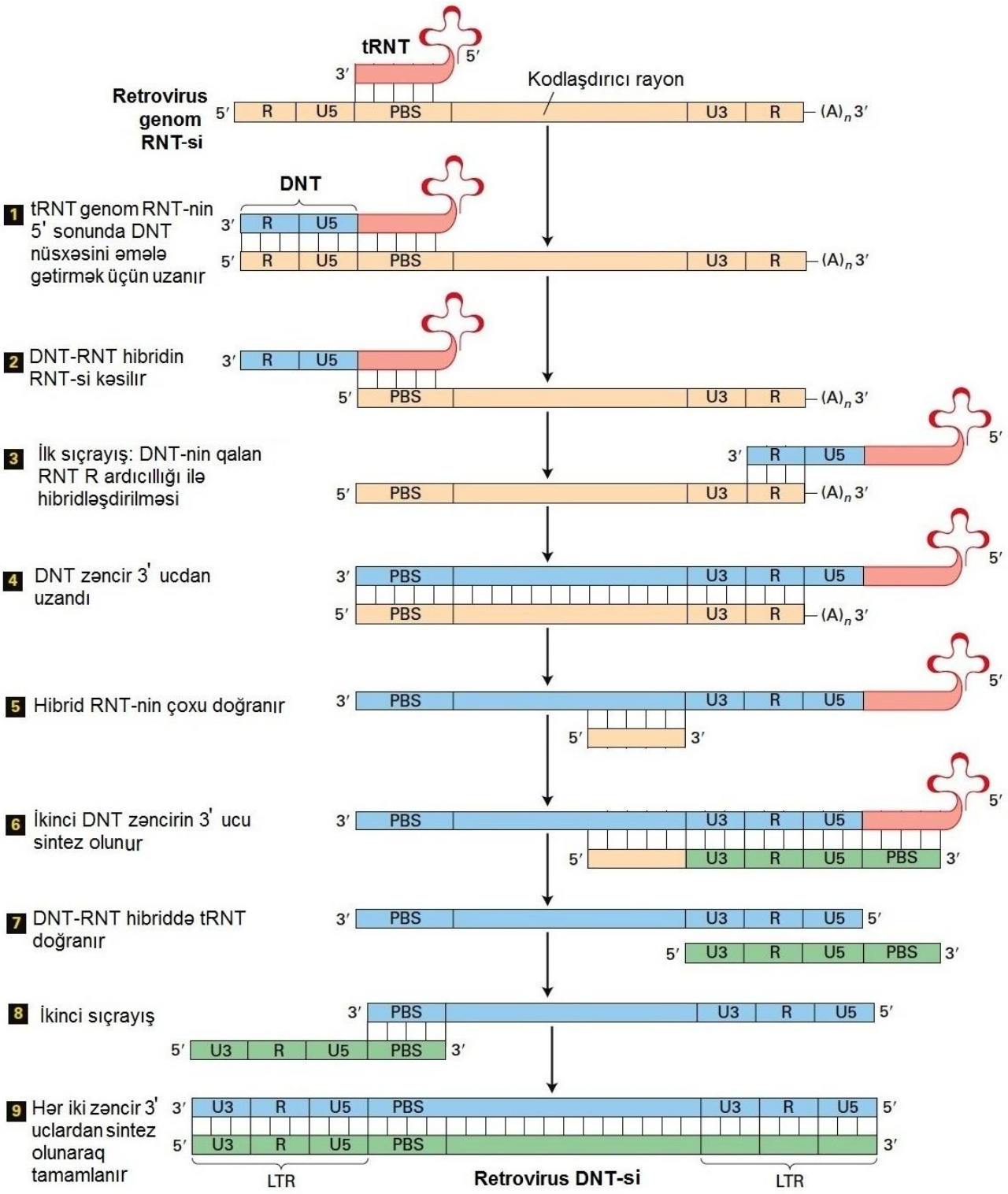
Bizim burada müzakirə edəcəyimiz LTR retrotranspozonlar maya göbələkləri üçün (məsələn, *Ty* elementlər) və *Drosophila* üçün (məsələn *copia* elementlər) ümumidir. Baxmayaraq ki, məməlilərdə qeyri-LTR retrotranspozonlarla müqayisədə LTR retrotranspozonlar azdır, amma yenədə onlar insanın genom DNT-sinin təxminən 8 faizini təşkil edirlər. Məməlilərdə LTR-lərə malik olmayan retrotranspozonlar mobil elementlərin daha çox yayılan formasıdır, bu növbəti bölmədə təsvir olunacaq.

Eukariotlarda tapılan LTR retrotranspozonların əsas quruluşu Şəkil 8-12-də təsvir olunmuşdur. Bütün transpozonlar üçün ümumi olan qısa 5′ və 3′ yönəlmiş təkrarlardan başqa bu retrotranspozonlara mərkəzi zülal-kodlaşdıran rayona cinahdan bitişik olan LTR-lərin olduğu da qeyd olunmuşlar. Bu LTR retrotranspozonun tipindən asılı olaraq 250-600 əsas cütünə malik olan uzun birbaşa terminal təkrarlar inteqrasiya edən DNT retroviruslara xarakterikdir və retrovirusların həyat tsikli üçün kritik əhəmiyyət kəsb edir. LTR-lərin retroviruslarla oxşar olmalarından başqa, qabıq zülallar istisna olmaqla LTR retrotranspozonlar bütün ümumi tip retroviruslara aid olan zülalları kodlaşdırırlar. Qabıq zülalların olmaması LTR retrotranspozonlara sahib hüceyrədən tumurcuqlayaraq çıxmaq və başqa hüceyrələri yoluxdurmaq imkanından məhrum edir, amma onlar sahib hüceyrənin DNT-sinin yeni saytına keçirilə bilirlər. Onların retroviruslarla təmiz qohumluq əlaqələrinə görə bu sinif retrotranspozonlar çox hallarda *retroviruslara bənzər elementlər* adlanırlar.



ŞƏKIL 8-13 Retrovirus genom RNT-nin inteqrasiya olunmuş retrovirus DNT-dən yaradılması. Sol R rayonun birinci nukleotidində transkripsiyanı inisiasiya etmək üçün sol LTR hüceyrənin RNT plomerazasını yönəldir. Nəticədə əmələ gəlmiş ilkin transkript sağ LTR-dən kənara genişlənir. İndi sağ LTR ilkin RNT transkripti təmsil edir, hüceyrə fermentlərini ilkin transkripti sağ R rayonun sonuncu nukleotidində doğramağa və poli(A) quyruğu əlavə etməyə yönəldir, nəticədə quruluşu Şəkil 8-14-də yuxarıda göstərilmiş retrovirus RNT genomu alınır. R ardıcıllıq virus genom RNT-sinin 5′ və 3′ uclarında (poli(A) quyruqdan öncə) dəqiq təkrarlanır. U5 və U3 virus genom retrovirus RNT-sində təkrarlanmayan və beləliklə unikal hesab edilən RNT-nin 5′ və 3′ uclarındakı ardlcıllıqlar hesab edilir (bax Şəkil 8-14). Guman olunur ki, oxşar mexanizm retrotranspozonların keçirilməsində (transpozisiyasında) RNT intermediatın alınmasında istifadə olunur. Hədəf-sayt DNT-nin qısa birbaşa təkrar ardıcıllığı (qara) retrovirus DNT-nin sahib hüceyrə genomuna inteqrasiyası zamanı yaranmışdır.

Retrovirusların həyat tsiklində əsas mərhələ inteqrasiya olunmuş retrovirus DNT-dən retrovirus genom RNT-nin yaranmasıdır (bax Şəkil 5-48). Bu proses LTR retrotranspozonların transpozisiyası zamanı RNT intermediatın yaradılması üçün model rolunu oynadığından biz onu burada təsvir edirik. Şəkil 8-13-də təsvir olunduğu kimi, sol tərəfdə retrovirus LTR promotor kimi fəaliyyət göstərərək retrovirus RNT-nin hər bir ucunda təkrarlanan 20 əsaslı R ardıcıllığının 5′ nukleotidində transkripsiyanın inisiasiyası üçün sahib-hüceyrənin RNT polimerazasını istiqamətləndirir. Aşağı istiqamətdə tam retrovirus DNT transkripsiya olunduqdan sonra, sağ-istiqamətdə LTR-ə müvafiq olan RNT ardıcıllığı əsas transkripti kəsərək poli(A) quyruğu R ardıcıllığın 3′ sonluğuna əlavə etmək üçün



ŞƏKİL 8-14 Retrovirus genom RNT-nin DNT-yə geriyə transkripsiyasının modeli. Bu modeldə doqquz mərhələnin mürəkkəbləşmiş sıraları retrovirusun bir zəncirli RNT genomunun ikizəncirli DNT sürətini yaradır. Genom RNT-si hüceyrənin retrovirus spesifik tRNT-si ilə onun 5′ sonluğuna yaxın *praymer birləşdirən sayt* (PBS) adlandırılan komplementar ardıcıllığa hibridləşərək viriona bükülür. Retrovirus RNT-nin hər iki ucunda qısa birbaşa terminal təkrar ardıcıllıq (R) vardir. Ümumi reaksiya dezoksiribonukleotidlərin polimerləşməsini kataliz edən geriyə transkriptaza ilə aparılır. Virus RNT-sində kodlaşdırılan və virion zərrəciyində bükülən RNT-azaH fermenti DNT-RNT hibridində RNT zəncirini doğrayır. Tam proses RNT templat zəncirdən uzun olan və hər iki ucunda uzun terminal təkrara (LTR) malik olan iki zəncirli DNT molekulunun yaranmasına gətirib çıxarır. Müxtəlif rayonlar miqyasda göstərilməmişdir. PBS və R rayonlar həqiqətdə U5 və U3 rayonlara nisbətən çox qısadır və mərkəzi kodlaşdırıcı rayon başqa rayonlara nisbətən daha uzundur. Bax E. Gilboa et al., 1979, *Cell***18**:93.]

sahib hüceyrənin RNT prosessinqi fermentlərini istiqamətləndirir. Nəticədə, LTR-dən tamamilə məhrum olan, əmələ gəlmiş retrovirus RNT genomu nüvədən çıxır və virion kimi bükülərək (qabıq zülallarla) tumurcuqlayıb sahib hüxeyrədən kənara çıxır.

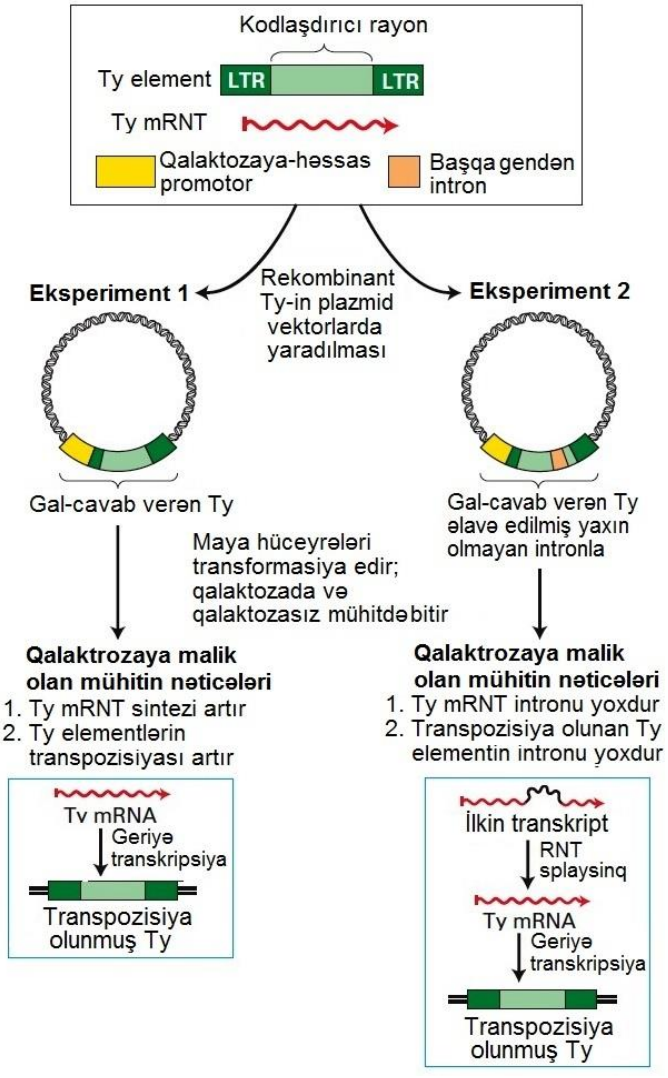
Retroviruslar hüceyrəni yoluxdurduqdan sonra, onun RNT genomu retrovirusla kodlaşdırılan geriyə transkriptaza fermenti ilə geriyə transkripsiya olunaraq tam LTR-lərə malik olan ikizəncirli DNT əmələ gətirir (Şəkil 68-14). DNT-nin bu sintezi sitozolda baş verir. Hər iki ucda LTR-ə malik olan iki zəncirli DNT, sonra retrovirusların kodlaşdırdığı digər ferment, inteqraza fermenti ilə kompleks şəkildə nüvəyə daşınır. Retrovirusların kodlaşdırdığı inteqrazalar DNT transpozonların kodlaşdırdığı transpozaza ilə çox yaxındır və oxşar mexanizmdən istifadə edərək iki zəncirli retrovirus DNT-ni sahib orqanizmin genomuna daxil edirlər. Baxmayaraq ki, geriyə transkripsiyanın mexanizmi mürəkkəbdir, o retrovirusun həyat tsiklinin kritik aspektidir. Bu proses transkripsiyanı dəqiqliklə R ardıcıllığın 5′ nukleotidindən inisiasiya etmək üçün promotor kimi fəaliyyət göstərən tamamlanmış 5′ LTR-i əmələ gətirir, halbuki bu zaman tamamlanmış 3′ LTR R ardıcıllığın 3′ nukleotidində poliadenilləşməyə aparan poli(A) sayt kimi fəaliyyət göstərir. Bu səbəbdən növbəti tsikl insersiyalara, transkripsiyalara, geriyə transkripsiyalara və təkrar yeni sayta keçirilmələrə qoşularkən LTR retrotranspozonlardan nukleotidlər itirilmir.

Yuxarıda qeyd olunduğu kimi, LTR retrotranspozonlar geriyə transkriptazanı və inteqrazanı kodlaşdırırlar. Retroviruslara anoloji olaraq bu mobil elementlər "sürətini çıxar-və-yerləşdir" mexanizmi ilə keçirlər, burada geriyə transkriptaza donor elementin RNT sürətini DNT-yə çevirir ki, sonuncu da inteqraza vasitəsi ilə hədəf sayta keçirilir. Şəkil 8-15-də verilmiş eksperiment, mayada Ty elemnetin keçirilməsində RNT aralıq vasitəçinin rolunu möhkəm dəlillərlə təsdiq edir.

İnsanlar üçün daha çox ümumi olan LTR retrotranspozonlar *ERV*-lər (*e*ndogen *r*etroviruslar) adlandırılır. 443000 ERV-ilə-əlaqəli DNT ardıcıllığı insan genomunda yalnız ayrılmış LTR-lərdən ibarətdir. Bunlar iki LTR arasında homoloji rekombinasiya yolu ilə tam uzunluqlu provirus DNT-dən alınmışdır, nəticədə daxili retrovirus ardıcıllıqlar silinmişdir. Bunlar kimi təcrid olunmuş LTR-lər genomda yeni mövqeyə keçirilə bilməz, amma genomda müxtəlif mövqelərdə olan homoloji LTR-lər arasındakı rekombinasiya görünür gen və eqzon təkrarlanmasına aparan xromosom DNT-sinin yenidən qurulmasında (düzülməsində), eqzonların yeni kombinasiyası ilə zülalların təkamülündə və Fəsil 9-da görəcəyimiz kimi, genlərin ekspressiyasına olan kompleks nəzarətin təkamülündə böyük rol oynamışdır.

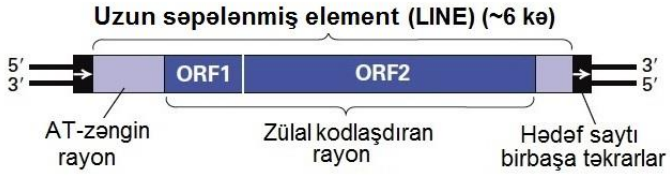
Qeyri-LTR Retrotranspozonlar Birbaşa Mexanizmlə Keçirlər

Məməlilərdə daha geniş yayılan mobil element, bəzən *viral olmayan retrotranspozonlar* adlandırılan LTR-ləri olmayan retrotranspozonlardır. Bu orta təkrarlanan DNT ardıcıllıqları məməlilərin genomunda iki sinfi formalaşdırır: *uzun səpələnmiş elementlər* (*long interspersed elements* – ***LINE***-lər) və *qısa səpələnmiş elementlər* (*short interspersed elements* – ***SINE***-lər). İnsanın tam uzunluqlu LINE-ləri təxminən ~6 kə uzunluqda, SINE-lər isə təxminən ~300 əc uzunluqdadır (bax Cədvəl 8-1).



EKSPERIMENTAL ŞƏKIL 8-15 Mayada Ty elementi RNT intermediat ilə keçirilir. Maya hüceyrələrinə tərkibində Ty olan plazmid transformasiya olunanda Ty element yeni saytlara transpozisiya edə (keçə) bilir, hərçənd ki, normal halda bu çox aşağı sürətlə baş verir. Yuxarda şəkili təsvir olunmuş elementdən istifadə etməklə tədqiqatçılar tərkibində qalaktozaya həssas promotora bitişik olan Ty elementlər yerləşdirilmiş iki müxtəlif rekombinant plazmid vektorları yaratdılar. Bu plazmidlərlə transformasiya olunan maya hüceyrələri tərkibində qalaktoza olan və qalaktoza olmayan mühitdə yetişdirildilər. Eksperiment 1-də, hüceyrələrin qalaktoza olan mühitdə bitməsi qalaktoza olmayan mühitlə müqayisədə çox artıq miqdarda transpozisiya ilə nəticələndi, bu göstərdi ki, mRNT intermediata transkripsiya Ty transpozisiyası üçün tələb olunur. Eksperiment 2-də əlaqədar olmayan maya genindən intron rekombinant qalaktozaya cavabdeh Ty elementin güman olunan zülal kodlaşdırıcı rayonuna keçirilmişdir.Transpozisiyası olunmuş Ty elementlərdə intronun müşahidə olunan yoxluğu kəskin şəkildə sübut edir ki, transpozisiyada sağ tərəfdə boksda göstərildiyi kimi, intronun RNT splaysinqi vasitəsi ilə çıxarılıb atıldığı RNT intermediat iştirak edir. Əksinə, qarğıdalıdakı Ac element kimi eukariotik DNT transpozonlar transpozaza geni daxilində intronlara malikdirlər, bu onu göstərir ki, onlar RNT intermediat vasitəsi ilə keçmirlər. Bax J.Boeke et al., 1985, *Cell***40**: 491.

LINE-lərə xarakterik olan təkrarlanan ardıcıllıqlar ibtidailərdə, həşaratlarda və bitkilərdə müşahidə olunmuşdur, amma naməlum səbəbdən onlar məməlilərin genomunda xüsusən zəngindirlər. SİNE-lər də həmçinin ilk dəfə məməlilərin DNT-sində tapılmışdır. Təkamülün gedişində ali eukariotlarda böyük miqdarda LINE və SINE-lər genomun bir neçə yerində ardıcıllıqların nüsxələrinin təkrar çıxarılması və yeni rayonlara keçirilməsi yolu ilə toplanmışdırlar.



ŞƏKİL 8-16 LINE-nin əsas quruluşu. Hədəf saytı birbaşa təkrarların uzunluğu genomun müxtəlif saytlarında LINE nüsxələri arasında fərqlənir. Hərçənd ki, L1 elementin tam uzunluğu 6 kə uzunluğa yaxındır, sol ucun dəyişkən miqdarı bu mobil elementlərin tapıldığı saytların 90 faizindən çoxunda yoxdur (itirilib). Qısa açıq oxunan çərçivə (ORF1) təxminən 1 kə uzunluqdadır, RNT birləşdirən zülalı kodlaşdırır. Təxminən 4 kə uzunluqda olan daha uzun ORF2, geriyə transkriptaza və DNT endonukleaza fəallıqlarına malik olan ikifunksiyalı zülalı kodlaşdırır. Qeyd etmək lazımdır ki, LINE-lər LTR retrotranspozolarda tapılmış uzun terminal təkrarlara malik deyillər.

LINE-lər İnsanın DNT-si transpozisiya mexanizminə görə oxşar olan, amma ardıcıllıqlarına görə fərqlənən üç əsas LINE ardıcıllığı ailəsinə malikdir: L1, L2 və L3. Yalnız L1 ailəsinin nümayəndələri müasir insan genomuna keçir. Göründüyü kimi L2 və ya L3-ün funksional nüsxələri yoxdur. LINE ardıcıllıqlar insan genomunda təxminən ~900000 saytda mövcuddur, ümumi insan DNT-sinin demək olar ki, 21 faizini təşkil edir. Tam LINE-nin əsas quruluşu Şəkil 8-16-da çəkilmişdir. LINE-lərə adətən cinahdan mobil elementlərin fərqləndirici əlaməti kimi qısa birbaşa təkrarla birləşir və iki uzun açıq oxunan çərçivəyə (ORF-lər, zülal kodlaşdıran rayonlardır, bax 8.4 bölməsinə) malikdirlər. ORF1 təxminən 1 kə uzunluqda olub RNT birləşdirən zülalı kodlaşdırır. ORF2 4 kə uzunluğa yaxın olub, retrovirusların və LTR retrotranspozonların geriyə transkriptazasına homoloji uzun rayona malik olan və eyni zamanda DNT endonukleaza fəallığı nümayiş etdirən zülalı kodlaşdırır.

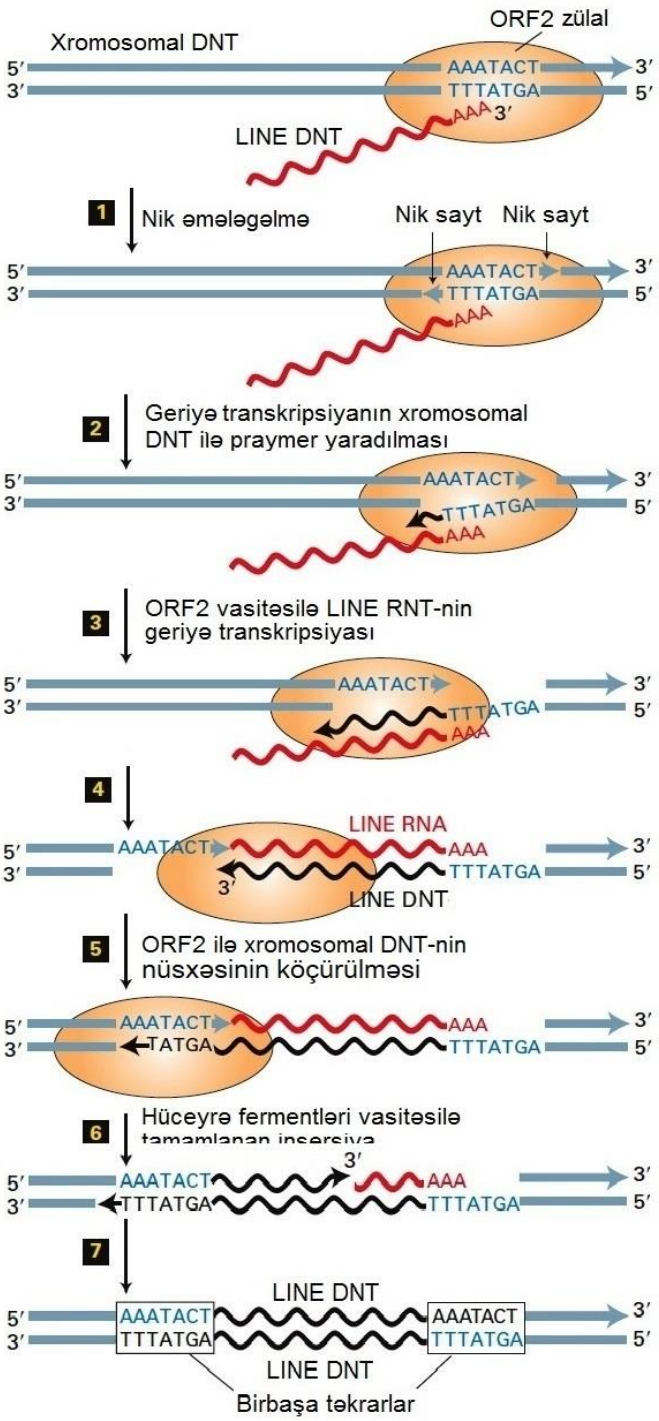
L1 elementlərin mobilliyinin sübutu ilk dəfə hemofliya və myotonik distrofiya kimi müəyyən genetik xəstəliklərə malik olan insanlardan klonlaşdırılmış DNT analizlərindən alınmışdır. Aşkar olunmuşdur ki, bu xəstələrdən alınmış DNT L1 elementin genə keçirilməsi nəticəsində yaranmış mutasiyanı daşıyır, halbuki valideyinlərin heç birində həmin gen daxilində bu element tapılmamışdır. İnsanda kifayət qədər güclü xəstəlik əmələ gətirən təxminən hər 600 mutasiyadan 1-i L1 transpozisiyanın və ya L1 ilə kodlaşdırılan zülallarla kataliz olunan SINE transpozisiyaların nəticəsində olur. Yuxarıda mayada Ty elementlərlə təsvir olunan (bax Şəkil 8-15) eksperimentə bənzər, sonralar aparılmış eksperimentlər təsdiq etdilər ki, L1 elementlər RNT intermediat ilə keçirlər. Bu təcrübələrdə intron siçanın klonlaşdırılmış L1 elementinə daxil edilir və rekombinant L1 element kulturaya keçirilmiş dağ siçanı hüceyrələrinə stabil tyransformasiya olunur. Hüceyrənin bir neçə dəfə ikiləşməsindən sonra L1 elementə uyğun olan, amma daxil edilmiş intronu olmayan DNT fraqmentləri hüceyrələrdə aşkar olunmuşdur. Bu kəşf qətiyyətlə sübut etdi ki, müəyyən zamandan sonra, daxil edilmiş introna malik olan rekombinant L1 element, intronları uzaqlaşdırmaq (atmaq) üçün RNT splaysinqinə uğrayan RNT intermediat vasitəsilə dağ siçanı genomunda yeni sayta keçirilmişdi.

LINE-lər LTR-lərə malik olmadığından onların RNT intermediat ilə transpozisiyası LTR retrotranspozonlardan fərqlənir. ORF1 və ORF2 zülallar LINE RNT-dən translyasiya olunurlar. İn vitro tədqiqatlar göstərir ki, RNT polimeraza ilə transkripsiya inteqrasiya olunmuş LINE DNT-nin sol sonluğunda promotor ardıcıllığı ilə istiqamətləndirilir. LINE RNT başqa mRNT-ləri poliadenilləşdirən eyni post-transkripsiya mexanizmi ilə poliadenilləşir. Sonra LINE RNT sitozola daşınır (keçirilir) və orada ORF1 və ORF2 zülallara translyasiya olunur. ORF1 zülalın çoxsaylı nüsxələri sonra LINE RNT-yə birləşir, ORF2 zülal isə poli(A) quyruğa birləşir. LINE RNT sonra ORF1 və ORF2 zülallarla kompleks şəkilində geriyə, nüvəyə daşınır və nüvədə ORF2 zülalı vasitəsilə LINE DNT-yə geriyə transkripsiya olunur. Bu mexanizm insersiya saytında hüceyrə DNT-nin pilləli doğranmasına səbəb olur, ardınca da Şəkil 8-17-də göstərildiyi kimi, əmələ gələn doğranmış hüceyrə DNT-si praymer kimi istifadə olunaraq geriyə transkripsiya ilə davam edir. Tam proses orjinal LINE retrotranspozonun nüsxəsinin xromosomal DNT-də yeni sayta keçirilməsi ilə nəticələnir. İki xromosomal DNT zəncirinin ilkin pilləli doğranması nəticəsində insersiya saytında qısa birbaşa təkrarlar yaranır.

Artıq qeyd olunduğu kimi, LTR retrotranspozonların DNT forması sitozolda hüceyrənin tRNT-sindən birinci DNT zənciri

üçün praymer kimi istifadə edərək onun RNT formasından sintez olunur (bax Şəkil 8-14). Nəticədə yaranmış uzun terminal təkrarlara malik olan iki zəncirli DNT sonra nüvəyə daşınır və orada rerotranspozonla kodlaşdırılan inteqraza vasitəsi ilə xromosom DNT-sinə inteqrasiya edir. Bunun əksinə qeyri-LTR retrotranspozonların DNT forması nüvədə sintez olunur. Qeyri-LTR retrovirus DNT-nin birinci zəncirinin geriyə transkriptaza olan ORF2 ilə sintezi doğranmış xromosomal DNT-nin 3′ sonluğunun praymer kimi istifadə olunması ilə həyata keçirilir, bu zaman 3′ sonluq praymeri qeyri-LTR retrovirus RNT-nin poli(A) quyruğu ilə əsas cütü əmələ gətirir (bax Şəkil 8-17, pillə1). Onun sintezi doğranmış xromosomun kəsilmiş ucları olan praymerlə baş verdiyindən və qeyri-LTR retrotranspozon DNT-nin başqa zəncirinin sintezi xromosom DNT-nin ilkin kəsiyinin digər tərəfində xromosom DNT-nin 3′ sonluq praymeri ilə aparıldığından (pillə 6),sintezin mexanizmi qeyri-LTR retrotranspozon DNT-nin inteqrasiyası ilə nəticələnir. Qeyri-LTR retrotranspozon DNT-nin insersiyası üçün inteqrazaya ehtiyac qalmır. Onun sintezi LINE RNT-dəki poli(A) quyruğun geriyə transkripsiyası ilə başlandığından qeyri-LTR retrotranspozonun bir ucu AT ilə zəngindir.

İnsan genomunda LINE-lərin böyük əksəriyyəti onların 5′ sonluğundan kəsilərək qısalır, bu göstərir ki, geriyə transkriptaza tamalanmadan dayanır və nəticədə alınmış fraqmentlər insersiya olunmuş poli(A) quyruqdan müxtəlif məsafələrdə uzanır. Belə qısalmaya görə LINE elementlərinin orta ölçüsü təxminən yalnız 900 əsas cütünə bərabər olur, hərçənd ki, tam uzunluqlu ardıcıllıq ~6 kə uzunluğa bərabərdir. Qısalmış LINE elementləri formalaşan kimi, böyük ehtimalla onlar sonra tranpozisiya olunmur, çünki tranpozisiyada onların RNT intermediatının yaranması üçün lazım olan promotoru yoxdur. L1 insersiyaların qısalması faktına əlavə olaraq demək olar ki, tam uzunluqlu elementlərin hamısı stop kodona və ORF1 və ORF2-də çərçivə sürüşməsi mutasiyalarına malik olur, yəqin ki, bu mutasiaylar təkamülün gedişində əksər LINE ardıcıllıqlarda toplanmışlar. Nəticədə, insan genomunda LINE ardıcıllıqların yalnız 0.01 faizə yaxını və ya ümumi sayının təxminən 60-a qədəri ORF1 və ORF2 üçün toxunulmamış intakt açıq oxunan çərçivəyə malikdir.



ŞƏKİL 8-17 LINE geriyə transkripsiyanın və inteqrasiyanın güman olunan mexanizmi. Burada yalnız ORF2 zülal təmsil olunur. Yeni sintez olunmuş LINE DNT qara rəngdə göstərilmişdir. Sitoplazmada LINE RNT-nin translyasiyası ilə istehsal olunan ORF1 və ORF2 zülallar LINE RNT-yə birləşərək onu nüvəyə daşıyır. Pillə 1: Nüvədə ORF2 AT-zəngin hədəf sayt DNT-ni kəsərək mavi ox başlıqlarla göstərilmiş DNT 3′-OH sonluqları yaradır. Pillə 2: T-zəngin DNT zəncirinin 3′ sonluğu LINE RNT-nin poli(A) quyruğuna hibridləşir və praymer kimi ORF2 ilə DNT sintezini həyata keçirir. Pillə 3: LINE RNT-dən templeyt kimi istifadə edərək ORF2 DNT zəncirini uzadır. Pillə 4 və 5: LINE DNT-nin aşağı zəncirinin sintezi LINE RNT templeytin 5′ sonluğuna çatanda ORF2, ilkin ORF2 pilləli doğrama yolu ilə yaradılmış hüceyrə DNT-nin yuxarı zəncirini templeyt kimi istifadə edərək yeni sintez olunmuş LINE DNT-ni uzadır. Pillə 6: Hüceyrənin DNT polimerazası yeni sintez olunmuş LINE DNT-nin aşağı zəncirini templat kimi istifadə etməklə, ilkin ORF2 pilləli kəsməsi ilə yaranmış yuxarı zəncirinin 3′ sonluğunu uzadır. Hüceyrə DNT-nin sintezi zamanı gecikən zəncirin RNT praymerlərinin uzaqlaşdırılması (bax Şəkil 5-29) zamanı olduğu kimi, DNT polimeraza yuxarı zəncir DNT-ni uzadan kimi LINE RNT doğranır. Hüceyrənin DNT sintezinin gecikən zəncirində olduğu kimi yeni sintez olunmuş DNT zəncirinin 3′ sonluğu, hüceyrə DNT zəncirlərinin 5′ sonluğuna liqasiya olunur. Bax D.D. Luan et al., 1993, *Cell***72**:595 götürülmüşdür

SINE-lər Mobil elementlərin insan genomunda geniş yayılmış ikinci sinifi, SINE-lər insan DNT-sinin təxminən 13 faizini təşkil edir. Uzunluqları 100-400 əsas cütü qədər dəyişilən bu retrotranspozonlar zülal kodlaşdırmırlar, amma əksəriyyəti LINE-lərdə olduğu kimi 3′ sonluğu A/T zəngin ardıcıllığa malikdirlər. SINE-lər tRNT, 5S rRNT və digər kiçik stabil RNT-

lərin genlərinin transkripsiyasını həyata keçirən eyni nüvə RNT polimerazası ilə transkripsiya olunurlar. Çox güman ki, tam uzunluqlu LINE-lərdən ekspressiya olunan ORF1 və ORF2 zülallar Şəkil 8-17-də göstəriləın mexanizmlə SINE-lərin geriyə transkripsiyasına və inteqrasiyasına vasitəçilik edirlər. Nəticədə, SINE-lərə LINE ilə kodlaşdırılan ORF1 və ORF2 ilə birləşmək və geriyə transkripsiya və inteqrasiya etmək üçün LINE RNT-lərlə rəqabət apararaq LINE simbiotlarının parazitləri kimi baxıla bilər.

SINE-lər insan genomunda təxminən 1.6 million saytda ortaya çıxırlar. Bunlardan 1.1 milliona qədəri *Alu elementləri*dir. Bu ona görə belə adlandırılır ki, onların çoxu vahid bir restriksiya fermenti *Alu*I ilə tanınma saytına malikdirlər. *Alu* elementlərinin 7SL RNT-dən yaranması güman olunan siqnal tanıyan zrrəcik kimi adlandırılan ribonukleozülal kompleksindəki sitozol RNT ilə əhəmiyyətli dərəcədə ardıcıllıq homologiyası göstərir. Bu zəngin sitozol ribonukleozülal zərrəciklər müəyyən polipeptidlərin endoplazmatik şəbəkənin membranları üçün hədəf olunmasına kömək edir (bax Fəsil 13). *Alu* elementləri insanın bütün genomu boyu o saytlarda səpələnmişdir ki, onların insersiyası genlərin ekspressiyasını qırmır: genlər arasında, intronlar daxilində və bəzi mRNT-lərin 3′ translyasiya olunmayan rayonlarında. Məsələn, doqquz *Alu* elementi insanın β-qlobin gen klasteri daxilində yerləşir (bax Şəkil 8-4a). Güman olunur ki, hər səkkiz fərddən birində baş verən, bir yeni rüşeyim xəttində olan qeyri-LTR retrotranspozisiyaların 40 faizə qədərində L1 elementlər, 60 faizində isə SINE-ləri daxildir və bunların 90 faizi *Alu* elementlərdən ibarətdir.

Digər mobil elementlər kimi SINE-lərin əksəriyyəti onların müasir insanların qədim əcdadlarında rüşeyim xəttinə insersiya olunduğu zamandan bəri toplanmış mutasiyalara malikdir. LINE-lərdə olduğu kimi çoxsaylı SINE-lər də 5′ sonluğundan kəsilərək qısaldılmışdır.

Başqa Retro keçirilmiş RNT-lər Genom DNT-də Tapılmışdır

Cədvəl 8-1-də göstərilmiş mobil elementlərdən başqa geniş müxtəlifliyə malik olan RNT-lərin DNT nüsxələri xromosomal DNT-yə inteqrasiya etmişdir. Bu ardıcıllıqların intronu olmadığından və funksional gen nüsxələrindəkinə bənzər cinah ardıcıllığına malik olmadığından onlar açıq şəkildə, qeyri-funksional hala keçən və əvvəllər müzakirə olunduğu kimi, psevdogenə çevrilən (Şəkil 8-4a) sadə duplikasiya olunmuş genlər deyillər. Əksinə, bu DNT seqmentləri görünür spalyas olunmuş və poliadenilləşmiş mRNT-nin retrotranspozisiya olunmuş nüsxələridir. mRNT kodlaşdıran normal genlərlə müqayisə etdikdə bu insersiya olunmuş seqmentlər əsasən çoxsaylı mutasiyalara malik olur və güman olunur ki, onların mRNT-ləri ilk dəfə geriyə transkripsiya olunduqdan və qədim əcdadın rüşeyim hüceyrəsi genomuna təsadüfi inteqrasiya etdikdən bəri yığılıb toplanmışlar. mRNT-lərin bu qeyri-funksional genom nüsxələri *prosessinq olunmuş psevdogenlər* adlanır. Prosessinq olunmuş psevdogenlərin əksəriyyəti qısa birbaşa təkrarlarla əhatə olunurlar ki, bu da onların hüceyrənin mRNT-lərinin daxil olduğu nadir retrotranspozisiya hadisəsi ilə yarandığı fərziyyəsini dəstəkləyir.

Kiçik nüvə RNT-ləri (snRNT-lər) və tRNT-ləri kodlaşdıran genlərin natamam və ya mutant nüsxələrini təmsil edən digər səpələnmiş təkrarlar məməlilərin genomunda tapılmışdır. mRNT-lərdən törənmiş prosess olunmuş psevdogenlər kimi kiçik RNT genlərinin qeyri-funksional nüsxələri kiçik birbaşa təkrarlarla əhatə olunur və çox güman ki, çox seyrək retrotranspozisiya hadisəsi nəticəsində əmələ gəlmiş və təkamül prosesinin gedişində toplanmışdır. Güman olunur ki, LINE-dən ekspressiya olunmuş fermentlər mRNT-ləri, snRNT-ləri və tRNT-ləri əhatə edən bütün retrotranspozisiyaları həyata keçirmişlər.

Mobil DNT Elementləri Təkamülə Kifayət Qədər Təsir Etmişlər

Hərçənd ki, mobil DNT elementləri öz mövcudluqlarını qoruyuyb saxlamaqdan savayı özgə birbaşa funksiyaya malik deyillər, onların mövcud olmasının bugünkü orqanizmlərin təkamülündə çox dərin təsiri olmuşdur. Əvvəldə qeyd olunduğu kimi, *Drosophila*-da spontan mutasiyaların təxminən yarısı mobil DNT elementlərinin transkripsiya vahidlərinin daxilinə və ya yaxınlığına keçirilməsi nəticəsində yaranmışdır. Məməlilərdə mobil elementlər spontan mutasiyaların çox kiçik hissəsinin yaranmasına səbəb olur: siçanda təxminən 10 faiz, insanlarda isə cəmi 0.1-0.2 faiz. Bu vaxta qədər mutant allellərdə tapılmış mobil elementlər insanın bir sıra genetik xəstəlikləri ilə bağlıdır. Məsələn, laxtalanma faktoru IX genin daxilinə insersiyalar hemofiliyaya səbəb olur, əzələ zülalı distrofini kodlaşdıran gen daxilinə insersiya isə Duşenne əzələ distrofiyasına səbəb olur. Laxtalanma faktoru IX və distrofini kodlaşdıran genlərin hər ikisi X xromosomda yerləşir. Uyğun olaraq bu genlər daxilinə transpozisiya nəticəsində baş verən xəstəlik əsasən kişilərdə baş verir, çünki kişilərdə baş verən mutasiyaya qarşı komplementar olan ikinci normal nüsxə yoxdur.

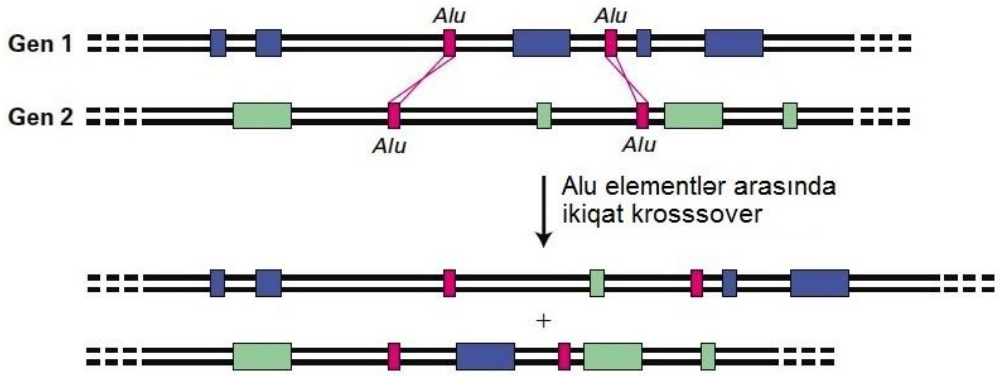
Ali eukariotlara aparan nəsil ağacında bütün əcdad genomu boyunca səpələnmiş mobil DNT elementləri arasında homoloji rekombinasiya ola bilsin ki, təkamül prosesində genlərin duplikasiyasını və digər DNT yenidəntəşkilini yaratmışdır (bax Şəkil 8-2b). Məsələn, fetal β-qlobin gen klasterinin müxtəlif primatlarda klonlaşdırılması və sekvensi insanın *HGB1* və *HGB2* genlərinin əcdad qlobin genlərin cinahında olan L1 ardıcıllıqların qeyri-bərabər homoloji krossoverindən törəndiyini dəlillərlə sübut etdi. Bu cür duplikasiya olunmuş genlərin sonrakı divergensiyası yəqin ki, hər bir gen ailəsinin üzvləri ilə bağlı olan fərqli, əhəmiyyətli funksiyanın qazanılmasına gətirib çıxara bilmişdir. Xüsusi genlərin intronları daxilində yerləşən mobil elementlər arasındakı qeyri-bərabər krossinqover bu genlər daxilində eqzonların duplikasiyasına gətirib çıxara bilmişdir (Şəkil 68-2a). Çox güman ki, bu proses oxşar zülal domenlərini kodlaşdıran oxşar eqzonlara malik olan genlərin təkamülünə təsir etmişdir, məsələn fibronektin genində olduğu kimi (Şəkil 5-16).

Bəzi dəlillər göstərməyə imkan verir ki, ali eukariotların takamülü gedişində *iki ayrı genin* intronları daxilində mobil DNT elementləri arasında da (məsələn, *Alu* elementlər) rekombinasiya baş verə bilir və artıq mövcud olan eqzonların yeni kombinasiyasından iki yeni gen yaranır (Şəkil 8-18). Eqzon qarışması (**exon shuffling**) adlanan bu təkamül prosesi ola bilsin ki, toxuma plazminogen aktivator Neu reseptorun və EGF

domenlərinə malik olan bütün epidermal boy faktoru genlərinin takamülünün gedişində baş vermişdir (bax Şəkil 3-12). Belə olan halda, eqzon qarışması ola bilsin ki, bu genlərin hər birinin əcdad formasının intronuna EGF domenini kodlaşdıran eqzonların daxil edilməsi nəticəsində yaranmışdır.

Göstərilmişdir ki, həm DNT transpozonlar həm də LINE transpozonlar Şəkil 8-19-dakı diaqramda göstərilmiş mexanizmlə yeni sayta keçirilərkən bəzən eqzonlar da daxil olmaqla qohum olmayan cinah ardıcıllıqları da aparırlar. Çox güman ki, bu mexanizmlər müasir genlərin təkamülünün gedişində eqzon qarışmasına kömək etmişdir.

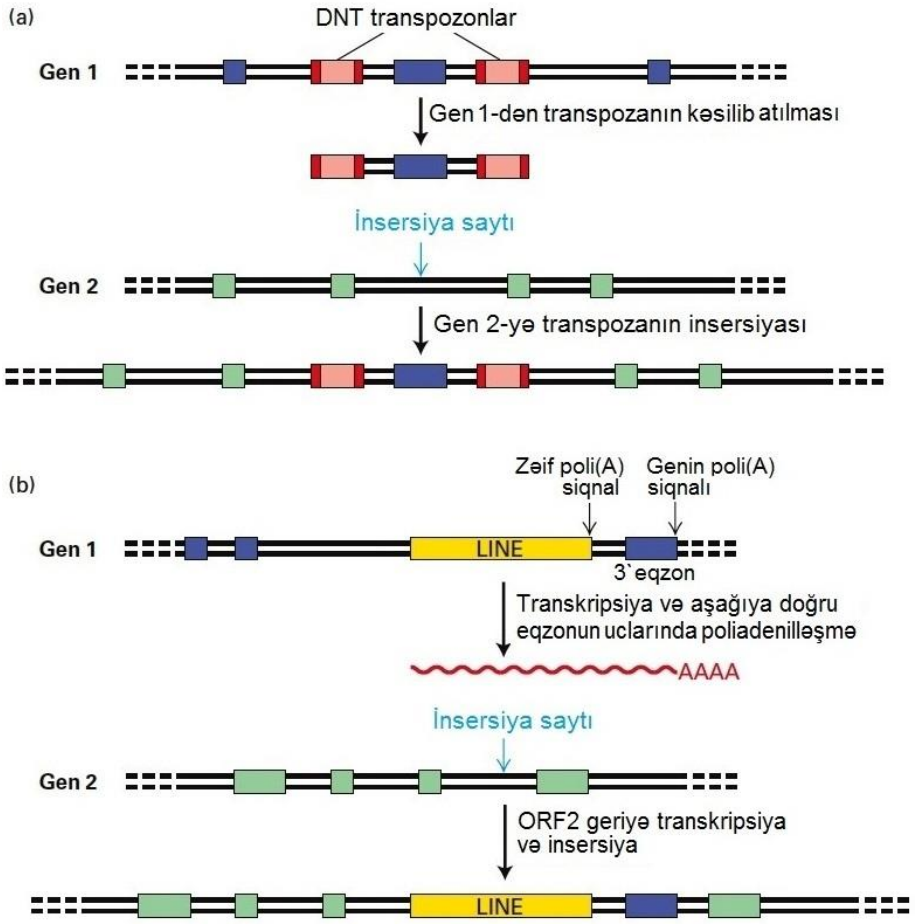
Genomda kodlaşdırıcı ardıcıllıqların dəyişilməsinə səbəb olmaqdan başqa mobil elementlər arasında rekombinasiya və DNT transpozonlara və retrotranspozonlara yaxın yerləşən DNT-nin yerdəyişməsi çox güman ki, genlərin ekspressiyasına nəzarət edən tənzimləyici ardıcıllıqların təkamülündə əhəmiyyətli rol oynamışdır. Əvəllər qeyd olunduğu kimi, eukariotik genlər enhanserlər adlandırılan transkripsiyaya nəzarət rayonuna malikdirlər, bunlar da on minlərlə əsas cütü qədər böyük məsafədən fəaliyyət göstərə bilirlər. Çox genlərin transkripsiyasına bir sıra enhanser elementlərin birgə təsiri ilə nəzarət olunur. Mobil elementlərin belə transkripsiya nəzarəti rayonları yaxınlığına daxil edilməsi yəqin ki, enhanser ardıcıllıqlarının yeni kombinasiyasının təkamülünə kömək edmişdir. Bunlar isə öz növbəsində xüsusi toxuma tiplərində ekspressiya olunan spesifik genlərə və yeni fəsildə müzakirə edəcəyimiz kimi, müasir orqanizmlərdə istehsal olunan kodlaşdırılmış zülalların miqdarına nəzarət edir.



ŞƏKİL 8-18 Səpələnmiş təkrarların homoloqları arasında rekombinasiya yolu ilə eqzon qarışması. Ayrı-ayrı genlərin intronlarında səpələnmiş təkrarlar arasında rekombinasiya eqzonların yeni kombinasiyası ilə əmələ gələn transkripsiya vahidini yaradır. Burada göstərilən nümunədə iki dəst *Alu* təkrarlar arasındakı ikiqat krossover iki gen arasında eqzonların mübadiləsi ilə nəticələnir.

Belə mülahizələr göstərir ki, mobil DNT elementlərinə tamamilə eqoist molekulyar parazitlər kimi olan əvvəlki baxışlar öz mənasını itirmiş olur. Əksinə, onlar ali orqanizmlərin təkamülünə: (1) gen duplikasiyası yolu ilə gen ailələrinin yaranmasına, (2) artıq mövcud olan eqzonların qarışdırılması ilə yeni genlərin yaradılmasına, (3) genlərin ekspressiyasına çoxtərəfli nəzarət edən daha mürəkkəb tənzimləyici rayonların formalaşmasına imkan yaratmaqla dərin kömək etmiş olurlar. Bu gün tədqiqatçılar müalicə genlərinin gen terapiyası kimi xəstəyə keçirilməsi üçün transpozisiya mexanizmini "cilovlamağa" cəhd edirlər.

Şəkil 8-19-da göstərilən prosesə analoji olan proses, müasir təbabətin əsas problemlərindən biri olan, patogen bakteriyalar arasında antibiotikə davamlılığın sürətlə yayılmasının əsasında durur. Antibiotikləri fəalsızlaşdıran fermentləri sintez edən bakterial genlər (dərmana davamlılıq geni) keçirilmiş ardıcıllıqlara cinah olan dərmana davamlılıq transpozonları yaradılmışdır. Antibiotiklərin təbabətdə tez-tez hallarda ehtiyac olmadan, onların təsir etmədiyi virus yoluxmalarına qarşı müalicə zamanı və sağlam kənd təsərrüfatı heyvanlarının yoluxmasına mane olmaq üçün geniş istifadə olunması bu cür konyuqasiya olunan plazmidlərə keçirilmiş dərmana dözümlülük transpozonlarının seçiminə səbəb olur. Konyuqasiya edən plazmidlər plazmidin replikasiya etməsinə və onun pilus adlanan mürəkkəb makromolekulyar borucuqlar vasitəsilə qohum bakterialara keçirilməsinə səbəb olan zülalları kodlaşdırır. R faktorlar (dərmana dözümlülük üçün) adlanan bu plazmidlər, transpozisiya yolu ilə daxil edilən və xəstəxanalarda olduğu kimi səthləri sterilləşdirmək üçün antibiotiklərin istifadə edildiyi mühitdə seçilmiş, çoxsaylı dərmana dözümlülük geninə malik ola bilirlər. Bu R faktorlar patogen bakteriyalar arasında çoxsaylı antibiotiklərə davamlılığın tez yayılmasına səbəb oldular. R faktorların sürətli yayılması ilə mübarizə müasir təbabətin əsas çağırışlarındandır.



ŞƏKİL 8-19 Transpozisiya yolu ilə eqzon yerdəyişməsi. (a) Homoloji DNT transpozonlara cinah olan eqzonun ikinci genin intronu daxilinə transpozisiyası. Bizim Şəkil 8-10 pillə 1-də gördüyümüz kimi, transpozaza transpozonun çevrilmiş təkrarlarının uclarında DNT-ni tanıya və kəsə bilir. Gen 1-də əgər transpozaza sol tərəfdə transpozonun sol ucundan kəsirsə, sağ tərəfdə isə transpozonun sağ ucundan kəsirsə, o bütün müdaxilə edən DNT-nin yerini, o cümlədən eqzonu 1-ci gendən 2-ci genin intronunda yeni sayta keçirilə bilər. Keçirilmədə son nəticə eqzonun 1-ci gendən 2-ci genə daxil edilməsidir. (b) Eqzonun LINE transpozisiyası yolu ilə başqa genə inteqrasiyası. Bəzi LINE-lər zəif poli(A) siqnallara malikdirlər. Əgər belə LINE 1-ci genin 3′-əsas intronundadırsa, transpozisiya zamanı onun transkripsiyası özünün poli(A) siqnalı ətrafında davam edə bilər və 1-ci genin özünü poliadenilləşmə və doğrama saytlarını transkripsiya edərək 3′ eqzona doğru uzana bilər. Sonra bu RNT geriyə transkripsiya oluna və LINE ORF2 zülal vasitəsilə (Şəkil 8-17) 2-ci genin intronuna inteqrasiya oluna bilər və yeni 3′ eqzonu (1-ci gendən) 2-ci genə keçirir.

8.3 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Transpozon (Mobil) DNT Elementləri

- Transpozon DNT elementləri ali eukariotların genomunda çoxsaylı müxtəlif saytlarda səpələnmiş orta təkrarlanan ardıcıllıqlardır. Onlar prokariotların genomunda daha az tezlikdə mövcud olurlar.
- DNT transpozonlar yeni sayta birbaşa DNT kimi keçirlər, retrotranspozonlar isə əvvəlcə elementin RNT nüsxəsinə transkripsiya olunurlar, sonra isə DNT-yə geriyə transkripsiya olunurlar (bax Şəkil 8-8).
- Bütün mobil elementlərin ümumi xüsusiyyəti onlarda transpozisiya zamanı DNT polimeraza tərəfindən doldurulan DNT hədəf-saytında pilləli kəsiklr nəticəsində əmələ gələn ardıcıllığa cinah olan qısa birbaşa təkrarların mövcud olmasıdır (bax Şəkil 8-10).
- Transpozonların özləri tərəfindən kodlaşdırılan fermentlər bu ardıcıllıqların genom DNT-də yeni saytlara daxil edilməsini kataliz edirlər.
- Quruluşuna görə bakterial IS elementlərə oxşar olan DNT transpozonlar eukariotlarda (məsələn *Drosophila*-da P element) rast gəlinsələr də, retrotranspozonlar əsasən daha zəngin olurlar, xüsusən də onurğalılarda.
- LTR retrotranspozonlar retrovirus DNT-lərə oxşar olaran uzun terminal təkrarlarla (LTR-lər) əhatə olunmuşlar, retroviruslar kimi onlar da geriyə trankriptazanı və inteqrazanı kodlaşdırırlar. Onlar genomda yerlərini dəyişərkən RNT-yə transkripsiya olunurlar, sonra isə sitozolda geriyə transkripsiyaya uğrayırlar, nəticədə yaranmış LTR-lərə malik olan DNT nüvəyə daşınır və sahib hüceyrənin xromosomuna inteqrasiya edir (bax Şəkil 8-14).
- Uzun səpələnmiş elementlər (LINE-lər) və qısa səpələnmiş elementlər (SINE-lər) daxil olmaqla qeyri-LTR retrotranspozonlarda LTR yoxdur və bir ucunda AT-zəngin ardıcıllığa malikdirlər. Güman olunur ki, onlar LINE ilə kodlaşdırılan zülalların vasitəçilk etdiyi, geriyə transkripsiyanın xromosomal DNT prayminqin daxil olduğu qeyri-virus retrotranspozisiya mexanizmi ilə yerini dəyişirlər (bax Şəkil 8-17).
- SINE ardıcıllıqlar kiçik hüceyrə RNT-ləri ilə geniş homologiya nümayiş etdirirlər və eyni RNT polimeraza ilə transkripsiya olunurlar. İnsanlarda daha geniş yayılan SINE-lər, *Alu* elementləri təxminən 300-əc uzunluqda olan ardıcıllıqdırlar, insan genomu boyu 1.6 million saytlarda səpələndikləri aşkar edilmişdir (bax Şəkil 8-4a).
- Bəzi səpələnmiş təkrarlar təkamül prosesinin müəyyən dövründə geriyə transkripsiya yolu ilə hüceyrə RNT-sindən törəyib genom DNT-sinə keçirilmişlər. mRNT-dən törənmiş prosessinq olunmuş psevdogenlərdə intronlar olmur, bu xüsusiyyət onları ikiləşmiş genlərin ardıcıllıq axını və ya sürüşməsi yolu ilə yaranan psevdogenlərdən fərqləndirir.

- Mobil DNT elementləri çox güman ki, qeyri-bərabər krossinqover zamanı homoloji rekombinasiya üçün saytlar kimi fəaliyyət göstərərək təkamülə əhəmiyyətli dərəcədə təsir etmişlər, genlərin və eqzonların duplikasiyasına (bax Şəkil 8-2), eqzon qarışdırılmasına (bax Şıkil 8-18) və qonşu DNT-lərin səfərbər edilməsinə səbəb olmuşlar (bax Şəkil 8-19).

8.4 Genomlar: Genlərin Quruluşunun və Ekspressiyasının Genom-Geniş Analizləri

Avtomatlaşdırılmış DNT ardıcıllığının oxunması metodlarından və kompüter alqoritmlərindən istifadə etməklə ardıcıllıq verilənlərinin hissələrini bir yerə yığaraq, tədqiqatçılar çox böyük miqdarda DNT ardıcıllıqlarını, o cümlədən təxminən insanın və çoxsaylı əsas eksperimental orqanizmlərin tam genom ardıcıllığını təyin etdilər. Yüksək sürətlə artan bu cürə çox böyük həcimdə verilənlər ABŞ-ın National Center for Biotechnology Information (NCBI), US National Institutes of Health, Almaniyada European Bioinformatics Institute at the European Molecular Biology Laboratory in Heidelberg, və Yaponiyada DNA Data Bank bazalarında saxlanılır. Bu verilənlər bazaları davamlı şəkildə yeni təqdim olunmuş ardıcıllıqların mübadiləsini edir (dəyişir) və onları İnternetlə bütün dünya alimləri üçün əlçatan edir. Hal-hazırda, genom ardıcıllıqları oxunması yüzlərlə viruslar və bakteriyalar üçün, əksər arxealar, maya göbələkləri (eukariotlar), düyü və qarğıdalı kimi ali bitkilər, həlqəvi qurd *C. Elegans* və meyvə milçəyi *Drosophila melanogaster* kimi əhəmiyyətli model eukariotlar, siçan, insan və metazoan taksonların təxminən 35-ə qədər taksonomik vahidin nümayəndələri üçün tamamlanmışdır və ya demək olar ki, tamamlanmaq üzrədir. Meqaəsasla DNT ardıcıllığının oxunmasının qiyməti o qədər aşağı enmişdir ki, xəstənin şiş hüceyrələrində toplanmış bütün mutasiyaların təyin edilməsi üçün eyni xəstənin xərçəng hüceyrələrinin genom ardıcıllığı sekvens olunaraq onun normal hüceyrəsinin genom ardıcıllığı ilə müqayisəli analiz olunur. Belə yanaşma bütün xərçəng xəstələri üçün ümumi olan mutasiya olunmuş genləri, həmçinin eyni xərçəng xəstəliynə tutulmuş (məsələn süd vəzi xərçəngi, yoğun bağırsağın xərçəngi) müxtəlif xəstələrdən alınmış şiş hüceyrələrində ümumi mutasiya olunmuş genləri aşkar edə bilər. Belə yanaşma tədricən sonda yüksək dərəcədə xüsusiləşmiş xərçəng xəstəliyinin ayrıca bir xəstədə şiş hüceyrəsindəki xüsusi mutasiyasına qarşı istiqamətləndirilmiş müalicəsinə apara bilər. Son zamanların avtomatlaşdırılmış DNT sekvens metodları o qədər güclüdür ki, insanlarda fenotiplə genotip arasındakı əlaqələri öyrənməyin əsası kimi, insanın genetik variasiya dərəcəsini təyin etmək üçün bütün dünyadan təsadüfi seçilmiş 2500 fərdin çoxunun genomlarının oxunması məqsədi ilə "1000 Genom Layihəsi" ("1000 Genomes Project") kimi məlum olan layihə hal-hazırda işlənilir. Bundan əlavə, xüsusi xəstəliklərin inkişaf etmə ehtimalına təsir edə bilən ardıcıllıq variasiyasını axtarmaq üçün fərdlərin çoxunun genom ardıcıllığını ~$100-a sekvens edəcək fərdi kompaniyalar yaradılmışdır.

Bu bölmədə, biz bəzi yolları araşdırırıq, tədqiqatçılar bunu genlərin funksiyası və təkamülündəki əlaqələr haqqında bilikləri təmin etmək üçün, heç bir zaman ayrılmamış zülalı kodlaşdıran yeni genlərin təyini üçün və genin nə vaxt və harada ekspressiya olunduğunu təyin etmək üçün verilənlər xəzinəsi hesab edirlər. Ardıcıllıq verilənlərini analiz etmək üçün kompüterlərin bu cür istifadəsi biologiyanın yeni sahəsinin – *bioinformatikanın* yaranmasına gətirib çıxardı.

Saxlanılan Ardıcıllıqlar Yeni İdentifikasiya Olunmuş Genlərin və Zülalların Funksiyalarını Təklif Edir

Fəsil 3-də müzakirə olunduğu kimi, oxşar funksiyaya malik olan zülallar çox hallarda oxşar aminturşu ardıcıllığına malik olurlar, bu da zülalların üçölçülü quruluşundakı əhəmiyyətli funksional domenlərə uyğun gəlir. Yeni klonlaşdırılmış genlər tərəfindən kodlaşdırılan zülalların aminturşu ardıcıllıqlarının funksiyası məlum olan zülalların ardıcıllığı ilə müqayisə edərək, tədqiqatçılar kodlaşdırılan zülalın funksiyasının təyini üçün bu zülalların ardıcıllıq oxşarlığına baxa bilərlər. Genetik kodun degenerativliyinə görə qohum zülallar həmişə onları kodlaşdıran genlərə nisbətən daha çox ardıcıllıq oxşarlığı nümayiş etdirirlər. Bu səbəbdən, adətən müvafiq DNT ardıcıllıqlarından daha çox zülal ardıcıllıqları müqayisə olunur.

Bu məqsədlə daha geniş istifadə olunan kompüter proqramı BLAST (*b*asic *l*ocal *a*lignment search *t*ool) kimi məlumdur. BLAST alqoritmi "yeni" zülal ardıcıllıqlarını (*sorğulu ardıcıllıq* kimi məlum olan) qısa seqmentlərə ayırır və sonra verilənlər bazasında saxlanılan ardıcıllıqlardan əhəmiyyətli dərəcədə istənilən uyğun gələni axtarır. Uyğun gələn proqram yüksək dərəcədə identik uyğun olan amin turşularını və az dərəcədə uyğun gələn amma yaxın olan (məsələn, hidrofobluğa, polyarlığa, müsbət yüklənmiş, mənfi yüklənmiş) aminturşu ardıcıllıqlarını təyin edir. Seqmentlər üçün əhəmiyyətli dərəcədə oxşarlıq tapılanda, BLAST alqoritm həmin zonada oxşarlıq axtarışını genişləndirir. Axtarış qurtardıqdan sonra, proqram sorğulanan zülalla uyğun gələn müxtəlif məlum zülallar arasında onların *p-qiymətlərinə* görə uyğunluq cərgəsini yaradır. Bu parametr iki zülal ardıcıllığı arasında təsadüfə görə oxşarlıq dərəcəsinin tapılmasının ehtimallıq ölçüsüdür. *p*-qiyməti nə qədər aşağı olarsa iki ardıcıllıq arasında ardıcıllıq oxşarlığı bir o qədər yuxarı olur. *p*-qiyməti təxminən 10^{-3}-dən aşağı olanda, bir qayda olaraq bu iki zülalın ümumi əcdaddan törədiyi barədə əhəmiyyətli dəlil hesab edilir. BLAST-la yanaşı çoxsaylı müxtəlif alternativ kompüter proqramları yaradılmışdır ki, bunlar da BLAST-la aşkar oluna bilməyən, bir-birinə daha uzaq qohum olan zülallar arasında münasibətləri aşkar edə bilir. Bu cür metodların aşkar edilməsi hal-hazırda bioinformatika tədqiqatlarının fəal sahəsidir.

Bu cür ardıcıllıq müqayisəsinin gücünü təsvir etmək üçün biz insan geni NF1-ə baxaq. NF1-in mutasiyası irsi xəstəlik neyrofibromatozis 1 ilə əlaqəlidir, bu zaman periferial sinir sistemində çoxsaylı şişlər inkişaf edir və dəridə böyük qabarıqların yaranmasına səbəb olur. NF1-in kDNT-si ayrıldıqdan və sekvens olunduqdan sonra, NF1 zülalın əldə olumuş ardıcıllığı GenBankda olan bütün başqa zülalların ardıcıllığına qarşı yoxlanıldı. Aşkar olundu ki, NF1 zülalın bir rayonu mayada Ira adlanan zülalın bir hissəsi ilə kifayət qədər homologiya təşkil edir (Şəkil 8-20). Əvvəlki tədqiqatlar göstərmişdir ki, Ira GTP-aza fəallaşdıran zülaldır (GAP) və Ras

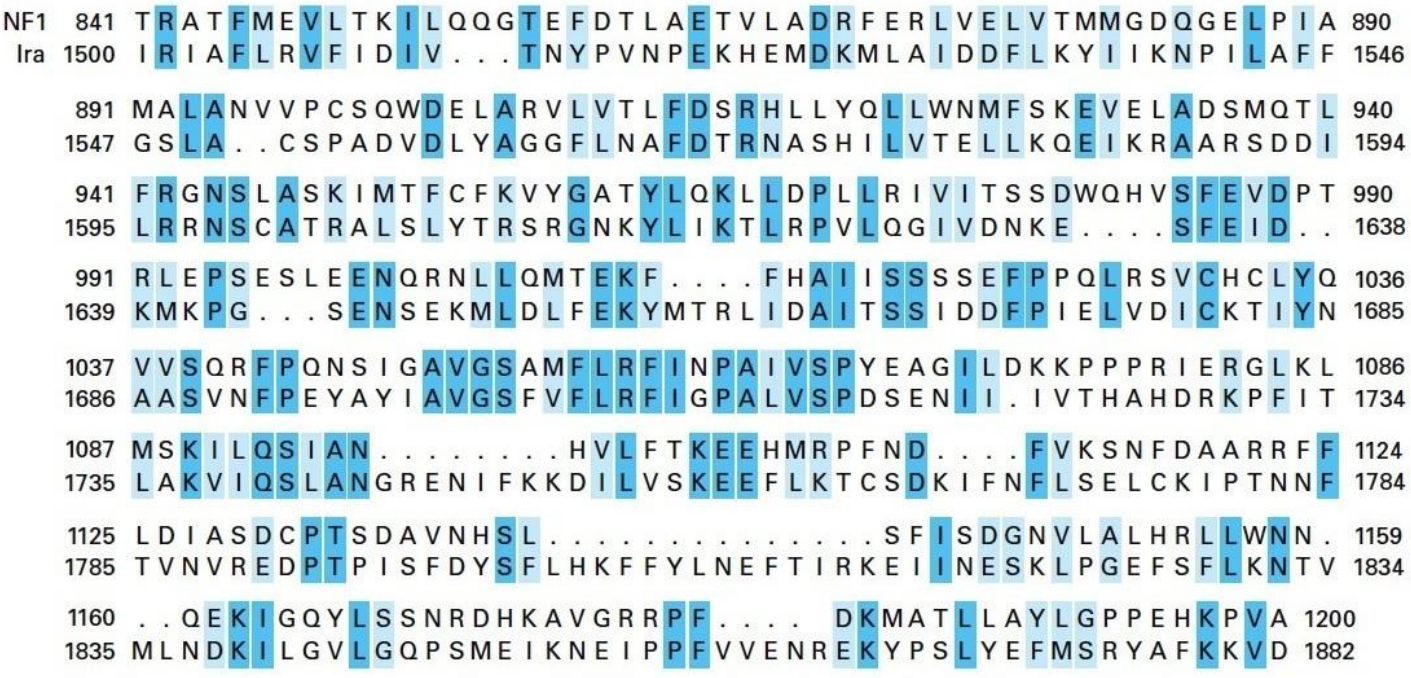
adlanan monomer G-zülalın GTP-aza fəallığını modulyasiya edir (bax Şəkil 3-34). Fəsil 16-da bizim ətraflı izah etdiyimiz kimi, GAP və Ras zülallar normal halda qonşu hüceyrələrdən gələn siqnallara cavab olaraq hüceyrə bölünməsinin və differensasiyasının nəzarət olunmasında fəaliyyət göstərirlər. Klonlaşdırılmış təbii formalı genin ekspressiyasından alınmış normal NF1 zülalın funksional tədqiqatları göstərdi ki, o həqiqətən də öz homoloqu Ira ilə göstərdiyi kimi, Ras fəallığını tənzimləyir. Bu tədqiqatlar göstərir ki, neyrofibromatozisə tutulmuş xəstələrdə periferial sinir sisteminin hüceyrələrində mutant NF1 zülalı ekspressiya olunaraq uyğun olmayan hüceyrə bölünməsinə və bu xəstəlik üçün xarakterik olan şişlərin əmələ gəlməsinə səbəb olur.■

Hətta zülal BLAST alqoritmi ilə başqa zülallara əhəmiyyətli dərəcədə oxşarlıq göstərməyəndə, o yenə də qısa ardıcıllıqda funksiyasına görə əhəmiyyətli olan oxşarlığa malik olur. Q**uruluş motifi**ləri adlanan belə qısa seqmentlər çoxsaylı müxtəlif zülallarda təkrarlanır və əsasən oxşar funksiyanı həyata keçirirlər. Fəsil 3-də bir neçə belə motif təsvir olunur və Şəkil 3-9-da göstərilmişdir. Bu və başqa motifləri yeni zülallarda axtarmaq üçün, tədqiqatçılar sorğulanan zülalın ardıcıllığını verilənlər bazasında məlum olan motif ardıcıllıqları ilə mqüayisə edirlər.

Müxtəlif Növlərin Qohum Ardıcıllıqlarının Müqayisəsi Zülallar Arasında Təkamül Əlaqələrinə Dəlilləri Verə Bilər

Qohum zülal ardıcıllıqlarının BLAST axtarışları zülalların zülal ailəsinə məxsus olmasını aşkar edə bilər. Əvvəllər biz insanlrın β-qlobin genlərini bir misal kimi istifadə edərək tək bir orqanizmin gen ailələrinə baxdıq (bax Şəkil 8-4a). Amma çoxsaylı orqanizmlərin genom ardıcıllığının daxil olduğu verilənlər bazasında zülal ailələri də qohum orqanizmlər arasındakı oxşarlıqlarına görə tanına bilər. Məsələn, hesab edək ki, tubulin zülalları sitoskelet sistemin əhəmiyyətli komponenti olan mikroborucuqların əsas subvahidləridir (Fəsil 18). Şəkil 8-21a-da verilmiş sadələşdirilmiş sxemə görə güman olunur ki, ilkin eukariotik hüceyrələr tək bir tubulin geninə malik olub, təkamülün erkən dövründə ikiləşmişdir (duplikasiya olunmuşlar), orjinal tubulin genin müxtəlif nüsxələrinin sonrakı divergensiyası α- və β-tubulin genlərinin qədim əcdad versiyalarını formalaşdırmışdır. Müxtəlif növlər ilkin eukariotik hüceyrələrdən yaranıb uzaqlaşdığından, bu gen ardıcıllıqlarının hər biri daha da uzaqlaşaraq indiki növlərin hər birində tapılmış α-tubulinin və β-tubulinin az fərqlənən formalarının yaranmasına səbəb olmuşlar.

Tubulin ailəsi genlərinin (və zülallarının) bütün müxtəlif nümayəndələri ardıcıllıqlarına görə kifayət qədər oxşar olub onların ümumi əcdad ardıcıllığa malik olduqlarını göstərir. Beləliklə, bütün bu ardıcıllıqlar *homoloji ardıcıllıqlar* hesab edilirlər. Daha spesifik olaraq, gen duplikasiyası nəticəsində divergensiya etmiş ardıcıllıqlar (məsələn, α- və β-tubulin ardıcıllıqları) *paraloqlar* hesab edilirlər. Növəməlgəlməyə görə yaranan (formalaşan) ardıcıllıqlar (məsələn, müxtəlif növlərdə α-tubulin genləri) *ortoloqlar* kimi təsvir olunur. Bu gün müxtəlif



ŞƏKİL 8-20 Kifayət qədər ardıcıllıq oxşarlığı göstərən insanın NF1 zülalının rayonları və *S.cerevisiae* Ira zülalının müqayisəsi. NF1 və Ira ardıcıllıqları uyğun olaraq hər bir sıranın yuxarısında və aşağısında bir hərfli amin turşusu kodları ilə göstərilmişdir (bax Şəkil 2-14). İki zülalda identik (eyni) olan amin turşuları tünd mavi rənglə işıqlandırılmışdır. Kimyəvi cəhətdən oxşar olan, amma yan zəncirləri eyni (identik) olmayan amin turşuları mavi nöqtələrlə birləşdirilmişdir. Qara nöqtələr zülal ardıcıllıqlarındakı homoloji aminturşuların düzülüşünü maksimallaşdırmaq üçün daxil edilmiş "boşluqları" göstərir. BLAST *p*-qiyməti bu iki ardıcıllıqlar üçün 10^{-28} olub onlar arasında yüksək dərəcədə oxşarlığı göstərir. Verilənlər G. Xu et al., 1990, *Cell***62**:559.

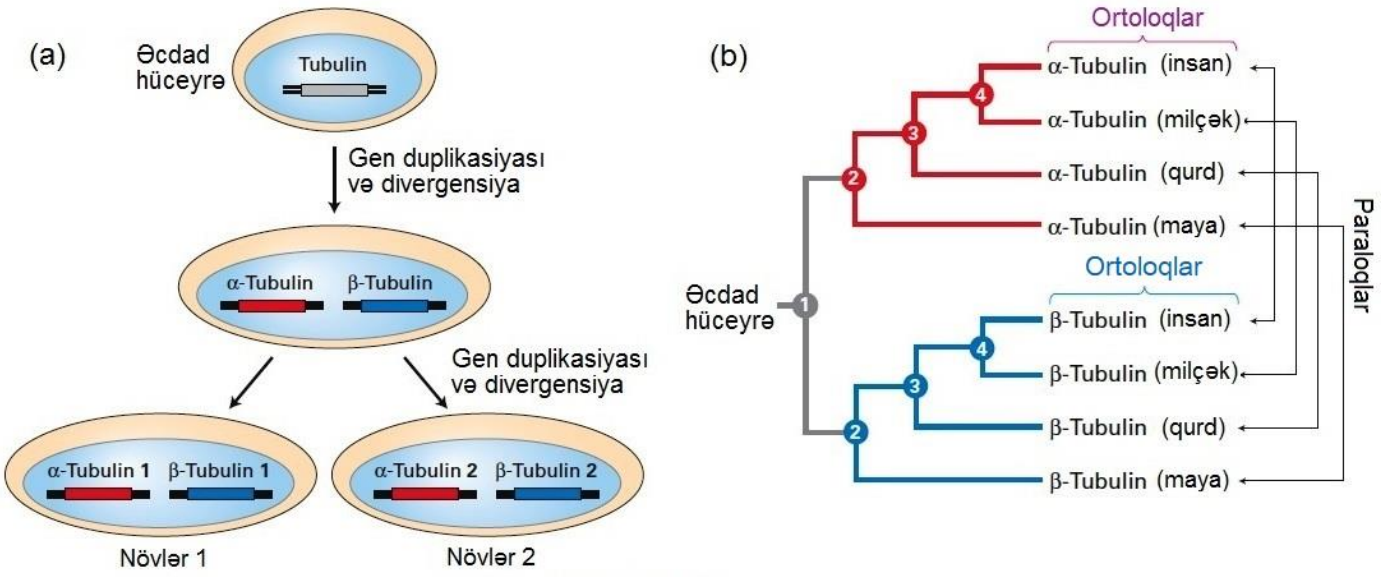
orqanizmlərdə mövcud olan tubulinlərin ardıcıllıqlarının yaxınlıq dərəcəsinə görə, Şəkil 8-21b-də göstərildiyi kimi, təkamül əlaqələri ortaya çıxarıla bilir. Üç tip ardıcıllıq əlaqələrindən ortoloq ardıcıllıqlar daha çox eyni funksiyanı bölüşürlər.

Genom DNT Ardıcıllığında Genlər İdentifikasiya Oluna Bilirlər

Orqanizmin genomunun tam ardıcıllığı, öz daxilində bu orqanizmin hüceyrələri tərəfindən istehsal olunan hər bir zülalın ardıcıllığının alınması üçün lazım olan informasiyanı saxlayır. Genomları çox az intronlara, qısa genlərarası rayonlara malik olan bakteriya və maya kimi orqanizmlərdə zülal kodlaşdıran ardıcıllıqlar, genom ardıcllığını sadəcə olaraq əhəmiyyətli uzunluqda olan açıq oxunan çərçivələrə (ORF-lər) görə skan etməklə tapıla bilər. ORF adətən genom DNT-sinin rayonu olub, ən azı 100 kodondan ibarətdir, start kodonla başlayır və stop kodonla qurtarır. Təsadüfi DNT ardıcllığının 100 kodonluq sırasında stop kodona malik olmama ehtimalı çox aşağı olduğundan, ORF-lərin demək olar ki, hamısı zülal kodlaşdırır.

ORF analizlər bakteriyalarda və mayada genlərin 90 faizdən çoxunu dəqiqliklə identifikasiya edir. Amma bəzi çox qısa genlər bu metodla aşkar olunmur və arabir gen olmayan uzun açıq oxunan çərçivələr təsadüfən meydana çıxır. Hər iki tip yanlış təyinedilmələr ardıcıllıqların daha mürəkkəb analizləri ilə və genlərin funksiyasının genetik yoxlamaları ilə düzəldilə bilir. Bu yolla müəyyən edilmiş *Saccharomyces* genlərinin təxminən yarısına qədəri, artıq mutant fenotiplər kimi bəzi funksional kriteriyalarına görə məlum idilər. ORF analizləri ilə identifikasiya olunmuş qalan ehtimal olunan (şübhəli) genlərin kodlaşdırdığı bəzi zülalların funksiyaları onların başqa orqanizmlərdəki məlum olan zülallarla ardıcıllıq oxşarlığına görə müəyyən edilmişdir.

Daha mürəkkəb genom quruluşuna malik olan orqanizmlərdə genlərin identifikasiyası açıq oxunan çərçivələri axtarmaq üçün istifadə olunanlardan daha mürəkkəb (məharətli) alqoritmləri tələb edir. Ali eukariotlarda genlərin çoxu bir-birindən çox hallarda kifayət qədər uzun kodlaşdırmayan intronlarla ayrılan, olduqca qısa, çoxsaylı eqzonlardan təşkil olunub, ona görə də ORF-lərə görə skaninq genlərin tapılması üçün çox zəif metoddur. Ən yaxşı gen tapan alqoritmlər xüsusi genom saytında genlərin mövcud olmasını göstərə bilən bütün mümkün olan verilənləri birləşdirir. Müvafiq məlumatlara: sorğu ardıcıllığının tam uzunluqlu kDNT-yə uyğunlaşdırılması; *ekpressiya olunmuş ardıcıllıqla yarlık* (*expressed sequence taq* – ***EST***) kimi tanınan, əsasən 200-400 əc uzunluqda olan xüsusi kDNT ardıcıllığı hissələrinin düzlənməsi; eqzon, intron, və splaysinq saytı ardıcıllığı üçün modellərə uyğunluq; başqa orqanizmlərdən olan genlərə ardıcıllıq oxşarlığı daxildirlər.



ŞƏKİL 8-21 Eukariotların təkamüli gedişində müxtəlif tubulin ardıcıllıqlarının yaranması. (a) Mövcud olan növlərdə tapılmış tubulin genlərin yaranmasında güman olunan mexanizm. Belə güman etmək olar ki, gen duplikasiyası prosesi növəmələgəlmədən öncə baş vermişdir, çünki müxtəlif növlərin (məsələn, insanın və mayanın) α-tubulin ardıcıllığı daha yaxındır, nəinki eyni növ daxilindəki α-tubulin və β-tubulin ardıcıllıqları. (b) Filogenetik ağac tubulin ardıcıllıqları arasındakı əlaqələri göstərir. Kiçik nömrələrlə göstərilmiş budaqlanma nöqtələri (buğumlar) iki ardıcıllığın ayrıldığı (divergensiyası) dövrdə ümumi əcdad geni göstərir. Məsələn, buğum 1 α-tubulin və β-tubulin ailələrinin yaranmasını həyata keçirən çoxalma (duplikasiya) prosesini göstərir, buğum 2 isə maya göbələyinin çoxhüceyrəlilərdən divergensiyasını göstərir. Fiqurlu mörtərizə və oxlar uyğun olaraq növəmələgəlmə nəticəsində fərqlənən ortoloq tubulin genləri və gen duplikasiyası nəticəsində fərqlənən paraloq genləri göstərir. Bu diaqram müəyyən qədər sadələşdirilmişdir, çünki milçəklər, qurdlar və insanlar həqiqətən də gen duplikasiyası nəticəsində sonralar meydana gələn çoxsaylı α-tubulin və β-tubulin genlərinə malikdirlər .

Kompüterə əsaslanan bu bioinformatik metodların istifadəsi ilə kompüter hesablama bioloqları insan genomunda təxminən ~21000 zülal kodlaşdıran geni identifikasiya etmişdi.

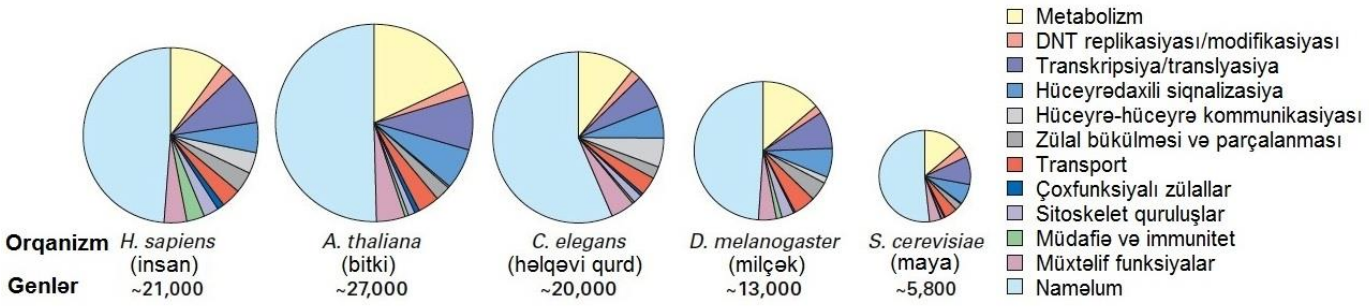
İnsan genlərini təyin etmək üçün xüsusən güclü metod insan genomu ardıcıllıqlarının siçan genomu ardıcıllıqları ilə müqayisəsidir. İnsanlar və siçanlar genlərinin çoxunun ümumiliyinə görə kifayət qədər yaxındırlar, hərçənd ki, genlərarası rayonlar və intronlar kimi qeyri-funksional DNT ardıcıllıqları çox fərqli olmağa meyillidirlər, çünki bu ardıcıllıqlar güclü selektiv təzyiq altında deyillər. Beləliklə, insan və siçan genomunun yüksək ardıcıllıq oxşarlığını nümayiş etdirən müvafiq seqmentləri: eqzonlar, transkripsiyaya nəzarət rayonları və ya hələ də məlum olmayan başqa funksiyaya malik olan ardıcıllıqlar çox güman ki, funksiyalarına görə çox böyük əhəmiyyət kəsb edirlər.

Orqanizmin Genomunda Zülal Kodlaşdıran Genlərin Sayı Onun Bioloji Mürəkkəbliyi ilə Birbaşa Əlaqəli Deyil

Gen-tapan (axtaran) kompüter alqoritmlərinin kombinasiyası və genom ardıcıllığının oxunması müxtəlif orqanizmlərdə zülal kodlaşdıran genlərin tam inventarını vermişdir. Şəkil 8-22 ardıcıllığı tam oxunmuş bir sıra eukariotik genomlarda zülal kodlaşdıran genlərin ümumi sayını göstərir. Bu genomlarda kodlaşdırılan zülalların təxminən yarısı ya məlumdur, ya da ardıcıllıq müqayisəsinə əsaslanaraq proqnozlaşdırılır. Bu müqayisənin bir təccübləndirici xüsusiyyəti ondan ibarətdir ki, müxtəlif orqanizmlər daxilində zülal kodlaşdıran genlər görünür onların bioloji mürəkkəbliyinə görə bizim intuitiv hissiyatımıza proporsional deyil. Məsələn, həlqəvi qurd *C. Elegans*, göründüyü kimi, daha böyük bədən quruluşuna və daha mürəkkəb davranışa malik olan meyvə milçəyi *Drosophila*-dan daha çox genə malikdir. İnsan isə *C. Elegans*-dan cəmi 5 faizə qədər artıq zülal kodlaşdıran genə malikdir. İnsanın zülal kodlaşdıran genlərinin sayının sadə həlqəvi qurdlarınkından çox kiçik sayda artıq olduğu ilk dəfə aşkar ediləndə anlamaq çətin idi ki, zülalların sayındakı belə kiçik artım təəccüblü dərəcədə mürəkkəbliyi necə əmələ gətirir.

Aydındır ki, müxtəlif orqanizmlərin genomunda genlərin sayında sadə kəmiyyət fərqləri onların bioloji mürəkkəbliyinin izahı üçün adekvat deyildir. Amma bir neçə fenomen ali eukariotlarda ekspressiya olunmuş zülallarda onların ardıcıllığına görə güman olunduğundan daha çox mürəkkəbliyi yarada bilir. Birincisi, pre-mRNT-nin alternativ splaysinqi xüsusi bir genə müvafiq olan çoxsaylı funksional mRNT-ləri verə bilir (bax Fəsil 10). İnsanlarda hər genə görə alternativ splaysinq yolu ilə əmələ gələn mRNT-lərin sayı təxminən 6-ya qədərdir. İkincisi, çox zülalların posttranslyasiya modifikasiyası zamanı variasiyalar funksional fərqləri yarada bilirlər. Nəhayət, üçüncüsü bioloji mürəkkəbliyin artması eyni növ zülallardan qurulmuş hüceyrələrin miqdarının artması ilə baş verir. Hüceyrələrin sayı nə qədər çox olarsa, onlar o qədər mürəkkəb kombinasiyada qarşılıqlı əlaqədə olurlar, necə ki, insanın və siçanın baş beyin qabığının müqayisəsində olduğu kimi. Həm insanın, həm də siçanın beyin qabığında oxşar hüceyrələr mövcuddur, amma insanlarda onlar daha mürəkkəb əlaqələri əmələ gətirirlər. Çoxhüceyrəli orqanizmlərdə bioloji mürəkkəbliyin artmasının təkamülü çox güman ki, embrioloji inkişafın getdikcə mürəkkəbliyinə aparan, orqanizmi əmələ gətirən hüceyrələrin replikasiyasının və gen ekspressiyasının zamana və məkana görə daha da kompleks tənzimlənməsini tələb edir.

Genom ardıcıllığının analizi yolu ilə identifikasiya olunmuş çox genlərin və zülalların spesifik funksiyası hələ də təyin edilməmişdir. Tədqiqatçılar müxtəlif orqanizmlərdə fərdi zülalların funksiyasını və daha sonra onların başqa zülallarla əlaqələrinin detallarını aşkar edən kimi, nəticədə alınmış tərəqqi dərhal başqa orqanizmlərdə olan bütün homoloji zülallara da tətbiq edilə biləcək. Bütün zülalların funksiyası məlum olanda, şübhəsiz ki, kompleks bioloji sistemlərin molekulyar əsaslarının daha mürəkkəb anlayışı ortaya çıxacaq.



ŞƏKİL 8-22 Müxtəlif eukariotların genomunda kodlaşdırılan zülalların sayının və tipinin müqayisəsi. Hər bir orqanizm üçün bütün dairəvi diaqramların sahəsi zülal kodlaşdıran genlərin ümumi sayını təmsil edir və hamısı təxminən eyni miqyasda göstərilmişdir. Əksəriyyət hallarda bu genlərin yarısı ilə kodlaşdırılan zülalların funksiyası hələ də məlum deyil (açıq göy rəngli). Qalanlarının funksiyası məlumdur və ya funksiyası məlum olan genlərin ardıcıllıqlarının oxşarlığına görə proqnozlaşdırılmışdır.[Verilənlər ENCODE Project Consortium, 2012, *Nature***489**:57; J. D. Hollister, 2014, *Chromosome Res.* **22**:103; L. W. Hillier et al., 2005,*Genome Res.* **15**:1651; FlyBase: FB2015_02 Release Notes, http://flybase.org/static_pages/docs/release_notes.html; *Saccharomyces* Genome Data Base2015, http://www.yeastgenome.org/genomesnapshot.]

8.4 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Genomiks: Genlərin Quruluşunun və Ekspressiyasının Geniş-Genom Analizi

- Ayrılmamış zülalın (sorğulanan zülal) funksiyası çox hallarda onun aminturşu ardıcıllığının funksiyası məlum olan zülalın aminturşu ardıcıllığına olan oxşarlığına əsaslanaraq proqnozlaşdırıla bilər.
- BLAST kimi məlum olan kompüter alqoritmi sorğulanan zülala olan kifayət qədər oxşar ardıcıllıqları tapmaq üçün çox hallarda məlum zülal ardıcıllıqlarının verilənlər bazasını axtarır.
- Bəzən kifayət qədər qısa olan ümumi funksional motifə malik olan zülalları tipik BLAST axtarışı ilə tapmaq mümkün olmur. Belə qısa ardıcıllıqlar quruluş motifi verilənlər bazasını axtarmaqla tapıla bilər.
- Zülal ailəsi eyni əcdad zülaldan törəmiş müxtəlif zülalları əhatə edir. Müvafiq gen ailəsini təşkil edən, bu zülalları kodlaşdıran genlər ilkin gen duplikasiyası nəticəsində və növələləgəlmə zamanı sonrakı divergensiyalar nəticəsində yaranmışdır (bax Şəkil 8-21).
- Gen duplikasiyası prosesi zamanı yaranmış qohum genlər və onların kodlaşdırdığı zülallar paraloqlar adlandırılır, məsələn hemoqlobində bir yerə cəmlənən α- və β-qlobinlər ($\alpha_2\beta_2$) kimi. Növələləgəlmə zamanı yığılıb toplanmış mutasiyalardan alınanlar ortoloqlar adlanırlar. Ortoloq olan zülallar adətən müxtəlif orqanizmlərdə oxşar funksiyanı yerinə yetirirlər.
- Açıq oxunan çərçivələr (ORF-lər) genom DNT-nin rayonu olub, start kodonla stop kodon arasında yerləşən ən azı 100 kodondan ibarətdir.
- Bütün bakterial və maya genom ardıcıllıqlarında açıq oxunan çərçivənin (ORF) kompüter axtarışı zülal kodlaşdıran genlərin əksəriyyətini dəqiqliklə nüəyyən edir. İnsanın və digər ali eukariotların genom ardıcıllığında ehtimal olunan genlərin identifikasiyası üçün onların gen quruluşunun mürəkkəbliyinə görə bir neçə tip əlavə verilənlər istifadə olunmalıdır, belə ki, qısa kodlaşdırıcı eqzonlar müqayisədə kifayət qədər uzun kodlaşdırmayan intronlarla bir-birindən ayrılmışdır
- Bir sıra müxtəlif orqanizmlərin tam genom ardıcıllığının analizi göstərir ki, bioloji müxtəliflik birbaşa zülal kodlaşdıran genlərin sayı ilə bağlı deyildir (bax Şəkil 8-22).

8.5 Eukariot Xromosomların Quruluşunun Təşkili

İndi biz artıq eukariotlarda tapılmış müxtəlif tipli DNT ardıcıllıqlarını, onların orada necə təşkil olunduqlarını araşdırdıq, indii isə eukariot hüceyrə daxilində DNT molekullarının bütövlükdə necə təşkil olunduğu sualına başlayırıq. Hüceyrədə DNT-nin ümumi uzunluğu hüceyrənin öz diametrindən yüz minlərlə dəfə böyük olduğundan DNT-nin hüceyrə daxilində bükülməsi hüceyrə arxitekturası üçün həlledici momentdir. Həmçinin uzun DNT molekullarının hüceyrə bölünməsi zamanı dəqiqliklə seqreqasiya edib qız hüceyrələrinə ayrılması anında bir-biri ilə dolaşıb düyün düşməsinə qarşı mane olmaq çox əhəmiyyətlidir. Xromosomal DNT-nin sıxılması prosesi və onun təşkili **histonlar** adlanan nüvə zülalları ilə həyata keçirilir. Histonlarla DNT molekullarının əmələ gətirdiyi kompleks isə **xromatin** adlanır.

Təxminən kütləsinə görə yarısı zülallardan və yarısı da DNT-dən təşkil olunan xromatin hüceyrənin interfazasında (mitoza getməyən hüceyrələr) bütün nüvə boyu səpələnmiş olurlar. Xromatinin mitoz dövründə daha da bükülməsi və sıxlaşması (bax Şəkil 6-3), morfoloji və rənglənmə xüsusiyyətləri əvvəllər sitogenetiklər tərəfindən öyrənilmiş görünə bilən *metafaza xromosomlarını* əmələ gətirir. Baxmayaraq ki, hər bir eukariotik xromosoma millionlarla molekul zülal daxil olur, amma hər bir xromosom yalnız həddən artıq uzun bir xətti DNT molekuluna malik olur. Məsələn, insan xromosomlarında ən uzun DNT molekulları 2.8×10^8 əsas cütündən ibarətdir və ya təxminən 10 sm uzunluqda olur. Xromatinin quruluş təşkili, belə həddən artıq uzun molekulun sıxlaşaraq mikroskopik ölçüdə məhdudlaşmış hüceyrə nüvəsinə yerləşməsinə imkan verir (bax Şəkil8-1). Bundan əlavə, xromatin elə təşkil olunmuşdur ki, xromatin daxilində xüsusi DNT ardıcıllığı transkripsiya, replikasiya, reparasiya və DNT molekullarının rekombinasiyası kimi xüsusi hüceyrə prosesləri üçün əldə edilə biləndir. Bu bölmədə, biz xromatinin xassələrinə və onun xromosomlar daxilində təşkilinə baxacağıq. Xromosomların çox mühüm xüsusiyyətləri onların tamlığı daxilində növbəti bölmədə baxılır.

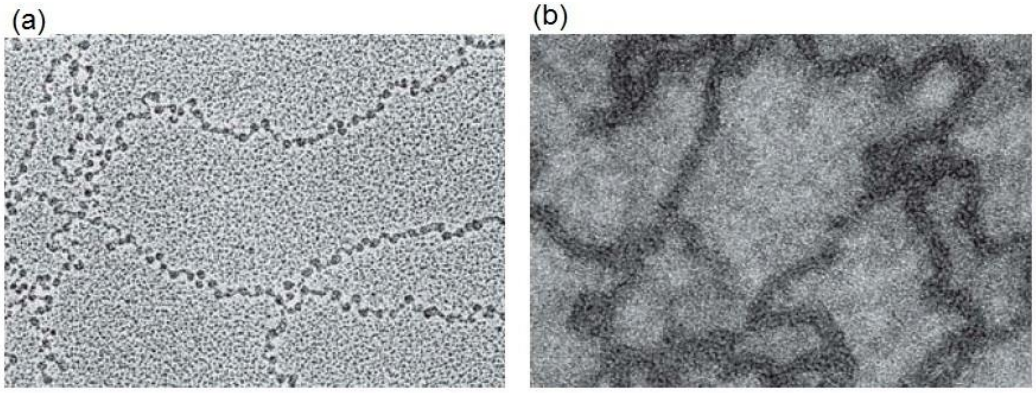
Xromatin Genişlənmiş və Sıxılmış Formalarda Olur

Eukariotik nüvədən DNT molekulu nativ DNT-zülal qarşılıqlı əlaqələrini qoruyub saxlayan metoddan istifadə etməklə ayrılarkən, o xromatin kimi məlum olan nukleozülal kompleksdə zülallarla bərabər kütlədə assosasiya olunmuş şəkildə ayrılır. Xromatin tərkibində ən zəngin zülallar olan histonlar kiçik əsasi zülallar ailəsini təşkil edirlər. Histon zülalların H1, H2A, H2B, H3, H4 kimi adlandırılan beş əsas tipi DNT molekulunda mənfi yüklənmiş fosfat qalıqları ilə qarşılıqlı əlaqə yaradan müsbət yüklənmiş əsasi amin turşuları ilə zəngindirlər.

Xromatini nüvədən ayrıb elektron mikroskopu ilə analiz edərkən, onun görünüşü onun məruz qoyulduğu duzun qatılığından asılı olur. Aşağı duz qatılığında və Mg^{2+} kimi ikivalentli kationların olmadığı halda ayrılmış xromatin "sapa düzülmüş muncuqlara" bənzəyir (Şəkil 8-23a). "Zəncirin" belə genişlənmiş forması "linker" DNT adlanan sərbəst DNT-dən və muncuğabənzər **nukleosomlar** adlanan quruluşları birləşdirən DNT-dən təşkil olunmuşdur. DNT və histon zülallardan təşkil olunmuş nukleosomlar 10 nm diametrdə olub xromatinin ilkin (əsas) quruluş vahidləridirlər. Əgər xromatin fizioloji duz qatılığında ayrılarsa, o 30 nm diametrdə lifəbənzər formada olur daha çox sıxlaşmış vəziyyəti alır (Şəkil 8-23b).

Nukleosomların Quruluşu Nukleosomların DNT komponenti onlar arasındakı linker DNT-yə nisbətən nukleaza ilə parçalanmaya çox-çox az həssasdırlar. Əgər nukleaza ilə təsir etməyə ehtiyatla nəzarət olunarsa, bütün linker DNT-lər parçalana bilər və fərdi nukleosomları öz DNT komponentləri

ilə birlikdə ayırmaq olar. Nukleosom onun səthi ətrafında DNT zəncirinin sap yumaq ətrafında sarındığı kimi sarınan zülal özəkdən ibarətdir. Zülal özək hər bir histon zülalının – H2A, H2B, H3 və H4 iki nüsxəsindən ibarət olan oktamerdir. Rentgen kristalloqrafiya quruluşu göstərdi ki, oktamer histon özəyi aralarında bir-biri ilə bağlanmış, təxminən disk formalı quruluşa malikdir (Şəkil 8-24). H3 və H4 histonlar H2A və H2B histonlar olmayarkən tetramer əmələ gətirirlər. H2A və H2B-nin iki tetrameri sonra H3-H4 tetramerlə assosasiya edir. Histon oktamerlərin səthindəki müsbət yüklər DNT ilə qarşılıqlı əlaqə rayonunda mənfi yüklənmiş DNT-ni histon oktamerə qarşı nukleosomun mərkəzində saxlayır. Bütün eukariotların nukleosomlarında təxminən 147 əsas cütünə malik olan DNT bir tam üçdə iki dəfə zülal özək ətrafında sarınır. Linker DNT-nin uzunluğu növlər arasında, hətta eyni orqanizmin müxtəlif hüceyrələri arasında 10-dan 90-a qədər əsas cütü arasında çox fərqlənir. Hüceyrənin replikasiyası zamanı replikasiya çəngəlinin dərhal ardınca DNT nukleosomlarda toplanır (bax Şəkil 5-32). Bu proses histonlara birləşərək onları bir yerə yığıb yeni replikasiya olunmuş DNT ilə nukleosomlarda toplayan spesifik çaperon molekullardan asılıdır.



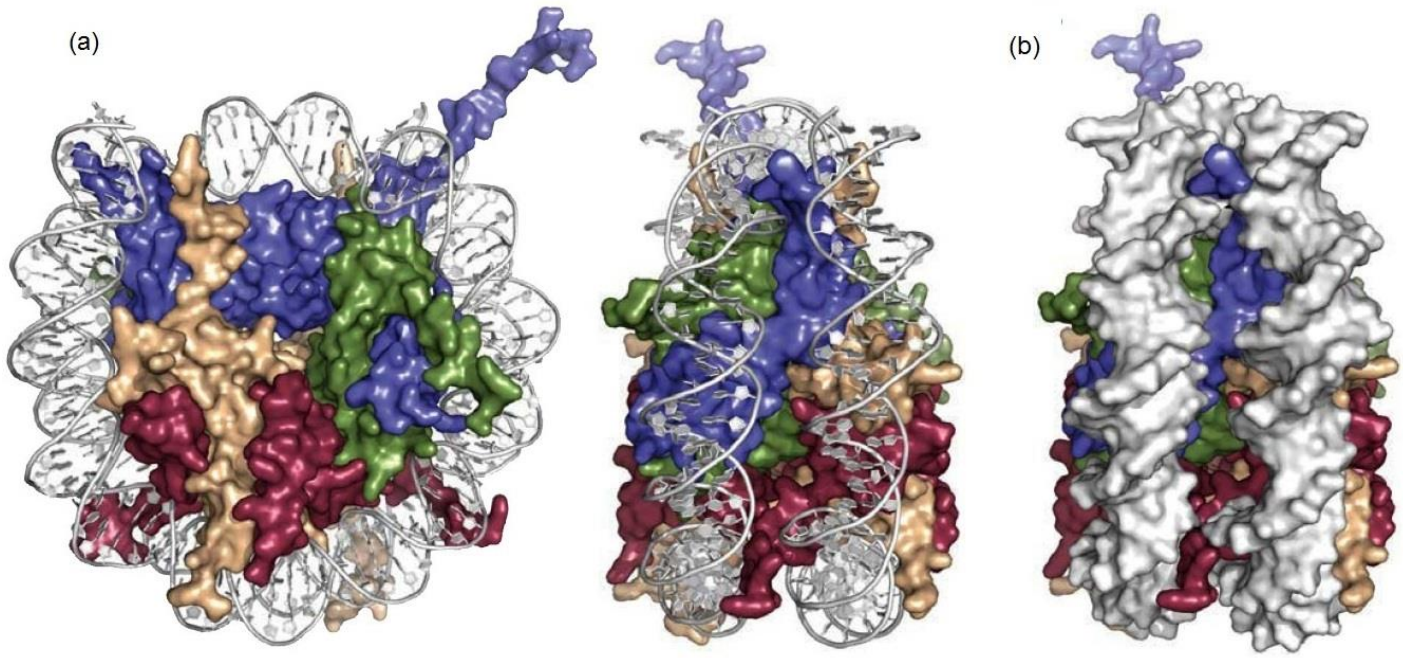
EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 8-23
Ekstraksiya olunmuş xromatinin genişlənmiş və qatılaşmış formaları elektron mikrofotosunda müxtəlif görünüşlərə malik olur. (a) Aşağı ion gücündə olan buferlə ayrılmış xromatin genişlənmiş "sapa-düzülmüş-muncuqlar" görünüşünə malik olur. Bu "muncuqlar" nukleosomlardır (10 nm diamerdə) sap isə onları birləşdirən "linker" DNT-dir. (b) Fizioloji ion gücünə malik olan buferdə (0.15 M KCl) ayrılmış xromatin sıxlaşmış 30 nm diametrdə olan liflər şəkilində görünür. [(a) hissəsi nəzakətlə Steven McKnight and O.Miller, Jr. verilmişdir; (b) hissəsi nəzakətlə Barbara Hamakalo və J.B. Rattner tərəfindən verilmişdir.]

30 nm-lik liflərin quruluşu Xromatin hüceyrələrdən izotonik buferdə ekstraksiya olunan zaman (məsələn, hüceyrədə tapılmış duz qatılığına uyğun qatılıqda olan bufer, ~0.15 M KCl, 0.004 M $MgCl_2$) onların çoxu 30 nm diametrdə olan liflər şəkilində ayrılır (bax Şəkil 8-23b). Uzun illər tədqiq olunmasına baxmayarq xromatinin 30 nm-lik xromatin liflərində toplanması mübahisəli qalmışdır. Kifayət qədər dəstəklənən bir geniş qəbul olunmuş modeldə nukleosomlar spiral konformasiyada düzülmüşlər, spiralın hər bir dönməsində altı və ya daha artıq nukleosom yerləşməklə *solonoid*i əmələ gətirirlər (Şəkil 8-25a). İkinci çox dəstəklənən modeldə, *iki-başlanğıc spiral* nukleosomlar sikkələr kimi bir-birinin ardınca iki "zəncirdə" yığılır və bu zəncirlər burularaq sol tərəfə burulmuş ikiqat zənciri əmələ gətirirlər (bax Şəkil 8-25b). 30 nm lifə beşinci əsas histon H1 də daxildir. H1 histon DNT-yə ounun nukleosom özəyinə girdiyi və çıxdığı anında bağlanır, amma 30 nm lifdə onun quruluşu atom dəqiqliyində məlum deyil.

Xromosomal rayonlarda transkripsiya və ya replikasiya olunmayan xromatin əsasən qatılaşmış (kondensasiya olunmuş) vəziyyətdə olur, 30 nm lif forması və yüksək dərəcəli bükülmüş quruluşların dəqiq konformasiyası hal-hazırda hələ tam məlum deyil. Fəal şəkildə transkripsiya olunan xromatin rayonları belə hesab olunur ki, "sapa-düzülmüş-muncuqlar" formasındadır.

Xromatin Quruluşunun Qorunub Saxlanması Xromatinin ümumi quruluşu bütün eukariotların hüceyrələrində, o cümlədən göbələklərdə, bitkilərdə və heyvanlarda qeyri-adi dərəcədə oxşardır, bu göstərir ki, xromatinin quruluşu eukariotların təkamülünün erkən vaxtından optimallaşmışdır. Dörd özək histonun (H2A, H2B, H3 və H4) aminturşu ardıcıllığı uzaq qohumlu növlər arasında da yüksək dərəcədə qorunub saxlanmışdır. Məsələn, H3 histonun aminturşu ardıcıllığı dəniz kirpisinin toxumasında və buzovun timusundakından yalnız bir amin turşusu ilə fərqlənir, eləcə də mədəni noxudla buzovun timusundan alınan H3 histon cəmisi dörd amin turşusu ilə fərqlənirlər. Görünür ki, histonların aminturşu ardıcıllığında əhəmiyyətli dərəcədə kənara çıxmalara qarşı sərt şəkildə seçim təkamüldə erkən başlanmışdır. Amma başqa bütün histonlardan fərqli olaraq, H1-in aminturşu ardıcıllığı orqanizmdən orqanizmə çox dəyişkən olur. Bütün eukariotlardan olan histonlar arasında aminturşu ardıcıllıqlarının oxşarlığı göstərir ki, onlar çox oxşar üçölçülü konformasiyada bükülürlər, bu da təkamülün erkən dövründə bütün müasir eukariotların əcdadlarında histonların funksiyası üçün optimallaşdırılmışdır.

Yüksək dərəcədə konservativ olan əsas tiplərdən fərqlənən genlərlə kodlaşdırılan kiçik histon variantlar da mövcuddur, xüsusən də onurğalılarda. Məsələn, H2A-nın H2AX kimi təyin edilən xüsusi forması xromatinin bütün rayonlarında nukleosomun çox az fraksiyasında H2A əvəzinə nukleosomlara daxil olur. Xromosomal DNT-də DNT-nin ikiqat zəncirinin qırılma saytında H2AX fosforlaşmış vəziyyət alır və xromosomun reparasiyası prosesində, çox guman ki, reparasiya



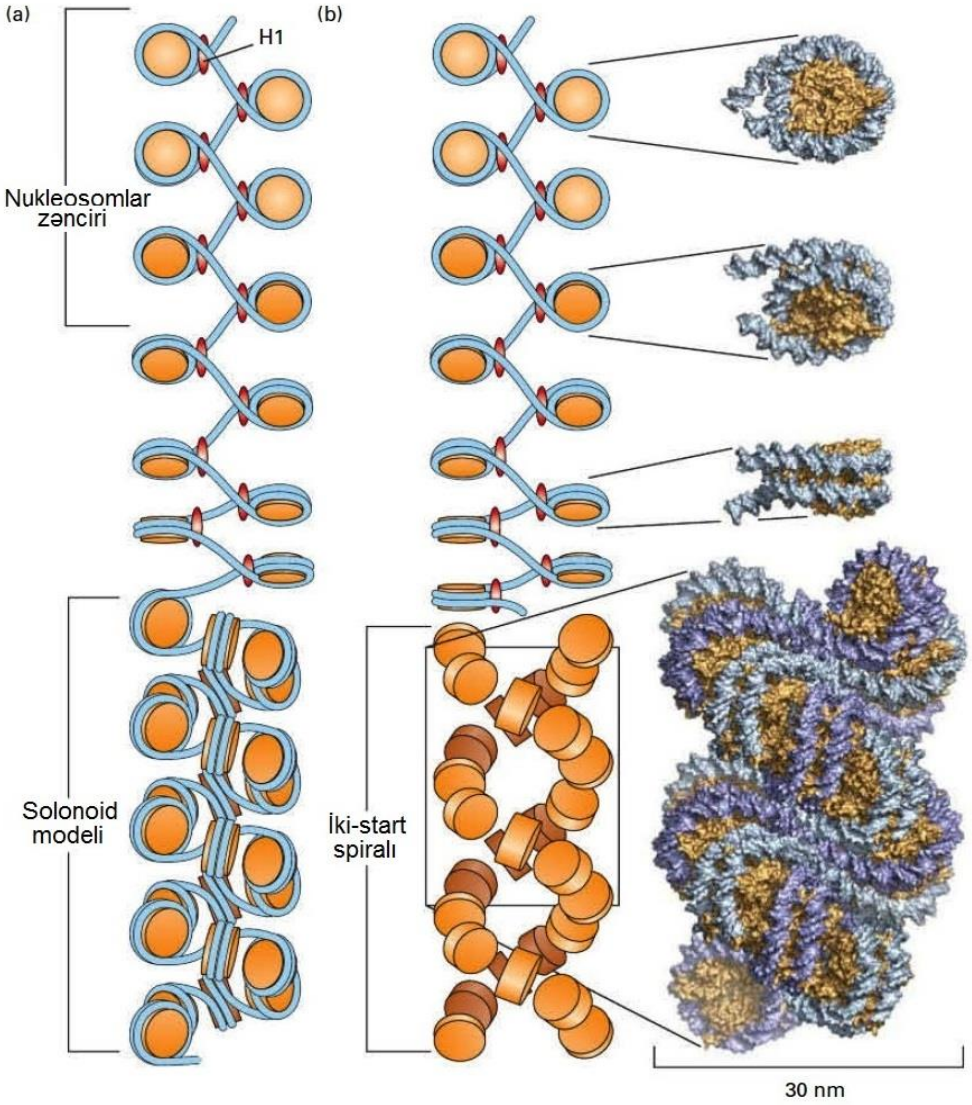
ŞƏKİL 8-24 Nukleosomun rentgen kristalloqrafiyasına əsaslanan quruluşu. (a) Nukleosom histonların fəza-dolduran modeli ilə. Histonların yaxşı görünməsi üçün DNT zəncirlərinin şəkər-fosfat özülü ağ borular kimi göstərilmişdir. Nukleosom yuxarıdan (*sol tərəfdə*) və yan tərəfdən (*sağ tərəfdən*, 90º saat əqrəbi istiqamətində fırlanmışdır) göstərilmişdir. H2A subvahidlər sarı rəngdə, H2B-lər isə qırmızı rəngdədirlər; H3-lər mavi rəngdə, H4-lər yaşıl rəngdədirlər. Səkkiz histonun N-sonluqlu quyruqları və xromatinin kondensasiyasına daxil olan H2A və H2B-nin C-sonluqlu quyruqları görünmürlər, çünki onlar kristalda nizamlanmamışlar. Bir H2A və H2B heterodimer yandan görünüşün aşağı sağ tərəfində səhifədən kənara uzanır, ikinci H2A və H2B heterodimer isə yandan görünüşün aşağı sol tərəfində səhifə daxilinə uzanır. Yuxarıdan görünüşdə yalnız bir H2A və H2B heterodimer görünür. Digər H2A, H2B heterodimer aşağı sağ tərəfdə H3, H4 tetramerin arxasında qaldığından bu görünüşdə görünmür. (Şəkil 8-26-da histon polipeptid zəncirindəki lent diaqramına da bax, burada yalnız bir H2A, H2B heterodimer nukleosomun yuxarıdan görünüşünün aşağı sol tərəfində görünür.) (b) Histonların və DNT-nin (ağ rəngdə) fəza dolduran modeli nukleosomun yan tərəfindən görünüşü. Həmçinin nukleosom özəyinin fırlanma hərəkətinə görə bax http://lugerlab.org[Verilənlər K. Luger et al., 1997, *Nature* **389**:251, PDB ID 1aoi-dən.]

edici zülallar üçün birləşmə saytı kimi fəaliyyət göstərərək iştirak edir. Sentromerlərdəki nukleosomlarda H3 histonu, mitoz zamanı iy tellərinin (spindel mikrborucuqlarının) birləşməsində iştirak edən CENP-A adlanan başqa histon variantı ilə əvəz olunur. H3 histonun H3.3 kimi məlum olan variantı DNT-nin transkripsiya olunan rayonunda, yəqin ki, RNT polimeraza xromatin daxilində DNT-ni transkripsiya edərkən histon çaperonlar histon oktameri yoldan uzaqlaşdırılarkən əsas histon H3-ü əvəz edir. Kiçik histon variantlarının çoxu aminturşu ardıcıllığına görə əsas histon variantlarından yüngülcə fərqlənir. Histon ardıcıllığında belə kiçik dəyişikliklər nukleosomların stabilliyinə və eləcə də onların 30 nm liflərə və digər daha yüksək dərəcəli quruluşda bükülməyə olan meyilliliyinə təsir edə bilər.

Histon Quyruğunun Modifikasiyaları Xromatin Kondensasiyasına və Funksiyasına Nəzarət Edir

Nekleosom özəyini düzəldən histon zülalların hər biri nukleosomun qlobulyar quruluşudan genişlənən 19-39 qalıqdan ibarət olan daxilən nizamsız, dəyişkən N-sonluğa malikdir (bax Şəkil 3-8); H2A və H2B zülallar qlobulyar histon oktamer özəkdən çıxan dəyişkən C-sonluğa da malikdirlər. *Histon quyruqlar* adlanan bu terminallar (sonluqlar) Şəkil 8-26-da göstərilən modeldə təsvir olunur. Histon quyruqlar xromatinin sapa-düzülmüş-muncuqlar konformasiyasından 30 nm-lik liflərə kondensasiya etməsi üçün tələb olunur. Məsələn, son zamanların təcrübələri göstərir ki, H4 histonun N-sonluqlu quyruğu, xüsusən lizin 16, 30 nm-lik lifin yaranması üçün kritik əhəmiyyətə malikdir. 30 nm liflərdə üst-üstə düzülmüş nukleosomlarda bu müsbət yüklənmiş lizin növbəti nukleosomun H2A-H2B interfeysindəki mənfi yüklü parçası ilə qarşılıqlı təsirdə olur.

Histon quyruqları, asetilləşmə, metilləşmə, fosforlaşma və ubikvitinləşmə kimi posttranslyasiya modifikasiyalarına məruz qalır. Şəkil 8-26b-də insan histonlarında müşahidə olunan post-translyasiya modifikasiyaları tiplərinin ümumi təsviri verilir. Xüsusi bir histon zülalı eyni vaxtda bütün bu modifikasiyaların hamısına malik olmur, amma adətən bir nukleosomda olan histonlar eyni zamanda bu modifikasiyalardan bir neçəsinə malik olurlar. Xromatinin müxtəlif rayonlarında tapılmış post-translyasiya modifikasiyalarının xüsusi kombinasiyaları, mövcud olan modifikasiyaların xüsusi kombinasiyasından asılı olaraq xromatinlə assosasiyada olan zülallar üçün birləşmə saytlarını yaratmaq və ya uzaqlaşdırmaqla xromatin funksiyasına təsir edən *histon kodlarını* təşkil edirlər. Biz burada

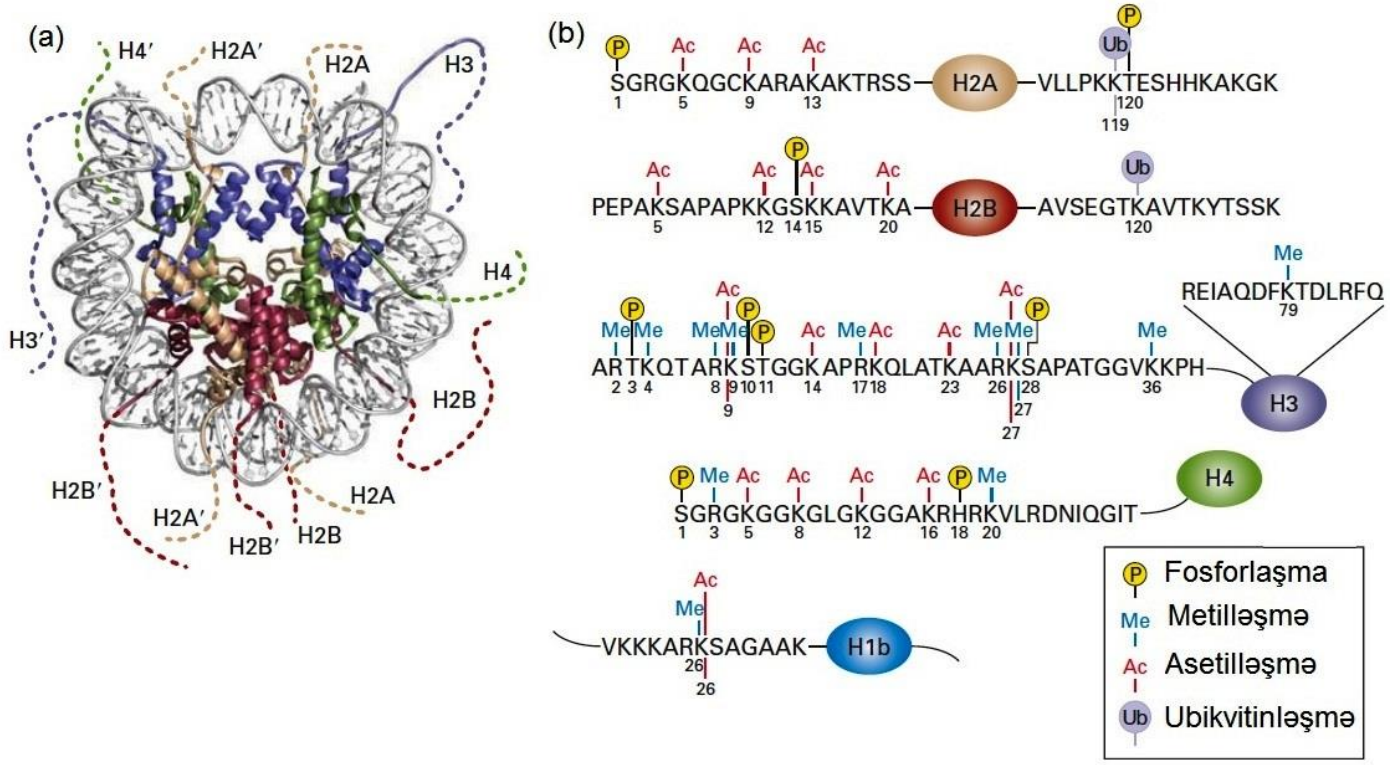


ŞƏKİL 8-25 30 nm xromatin liflərinin quruluşu. (a) Solonoid modelində nukleosomlar hər dönmədə altı və ya daha artıq nukleosom olmaqla sola burulan spiralda düzlənmişdir. Bax M. Kruithof et al., 2009, *Nature Struc. Mol. Biol.* **16**:534. (b) İki-başlanğıc spiral modelində, nukleosomların "ziq-zaq lenti" (*yuxarıda*) iki başlanğıclı-spiralda qatlanır (*aşağıda*). Sadəlik üçün iki-başlanğıclı spiralda DNT göstərilmir. Bax C.L.F.Woodcock et al., 1984, *J.Cell Biol.* **99**:42.[(b) hissəsi*yuxarı*dakıverilənlərK. Luger et al., 1997, *Nature* **389**:251, PDB ID 1aoi. (b) hissəsi*aşağıda* verilənlər T.Schalch et al., 2005, *Nature***436**:138,PDB ID 1zbb.]

histon quyruqlarında tapılmış ən zəngin modifikasiya tiplərini və bu modifikasiyaların xromatin kondensasiyasına və funksiyasına necə nəzarət etməsini təsvir edirik. Biz xromatin kondensasiyasının xüsusi halının müzakirəsi və məməlilərin dişi fərdlərində X xromosomların fəalsızlaşması ilə qurtarırıq.

Histon Asetilləşməsi Histon quyruğunun lizinləri, N-sonluqda xüsusi lizin qalıqlarına təsir edən fermentlərlə geriyə dönə bilən asetilləşməyə və deasetilləşməyə uğrayır. Asetilləşmiş formada lizin ε-amino qrupun müsbət yükü neytrallaşır. Yuxarıda qeyd olunduğu kimi, lizin 16 histon H4-də 30 nm liflərin bükülməsi üçün xüsusən əhəmiyyətlidir, çünki o lifdəki qonşu nukleosomun səthində mənfi yüklənmiş hissə ilə qarşılıqlı əlaqədə olur. Bu səbəbdən H4 lizin 16 asetilləşən zaman xromatin transkripsiyaya və replikasiyaya imkan yaradan, az kondensasiya olunmuş "sapa-düzülmüş-muncuqlar" konformasiyasına meyilli olur.

H4-dəki başqa saytlarda və başqa histonlardakı histon asetilləşməsi (bax Şəkil 8-26b) xromatin DNT-nin nukleazalarla parçalanmaya həssaslığının artması ilə korelyasiya olunur, bu müşahidələr histon asetilləşməsinin xromatinin az kondensasiya olunmuş forması ilə bağlı olduğunu göstərir. Bu korelyasiya ayrılmış nüvənin DN-aza I ilə parçalanması ilə aparılan eksperimentlərlə nümayiş etdirilə bilər. Parçalanmanın ardınca, DNT tamamilə xromatin zülallarından ayrılır, tam parçalanana qədər restriksiya fermentləri ilə doğranır və Sauzern blottinq vasitəsi ilə analiz olunur. Restriksiya fermenti ilə təsir edilmiş intakt gen xarakterik ölçülərdə olan fraqmentlərə ayrılır. Əgər ayrılmış nüvə əvvəlcə DN-azanın təsirinə məruz qoyulursa, gen restriksiya fermentinin kəsmə sərhədləri daxilində təsadüfi saytlardan doğrana bilər. Nəticədə, bu gen üçün normal halda görünən istənilən Sauzern blot bəndləri itəcəkdir. Bu metod ilk dəfə transkripsiyaya görə qeyri-fəal olan və kifayət qədər asetilləşməmiş histonlarla assosasiyada olan β-qlobin geninin qeyri-eritroid hüceyrələrdə, eritroid sələf hüceyrələrdə asetilləşmiş histonlarla assosasiyada olan fəal, transkripsiya olunan β-qlobin geninə nisbətən DN-aza I-ə qarşı çox davamlı olduğunu göstərmək üçün istifadə olunmuşdur (Şəkil 8-27) Bu nəticələr göstərir ki, *hipoasetilləşmiş* xromatində transkripsiya olunmayan DNT-nin xromatin quruluşu DNT-ni *hiperasetilləşmiş* xromatində transkripsiya olunan DNT-yə nisbətən DN-aza I fermenti (~10 kDa) üçün çox az əlçatan edir.



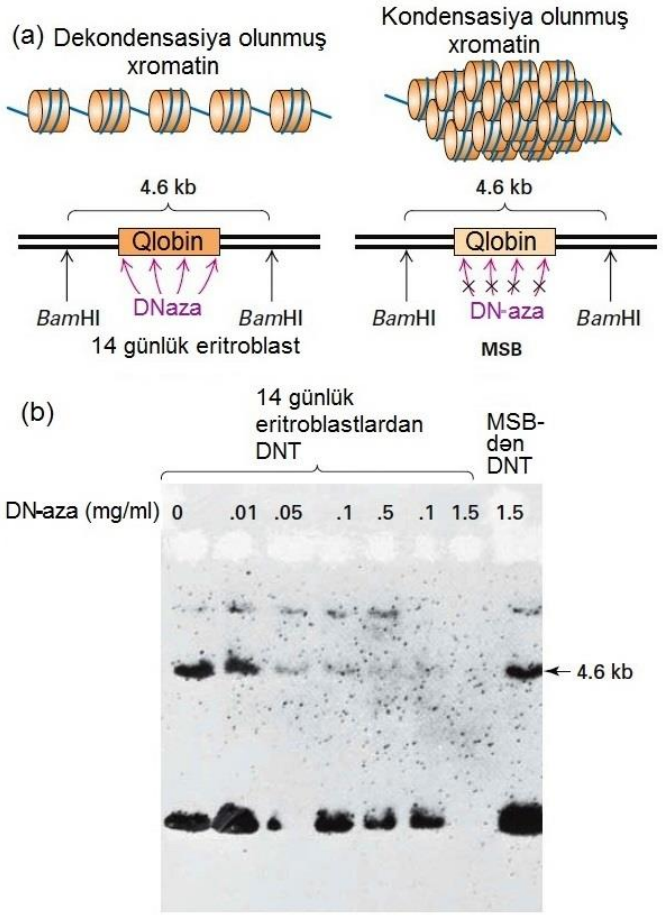
ŞƏKİKL 8-26 İnsan histonlarında müşahidə olunan post-translyasiya modifikasiyaları. (a) Nukleosom modelinin histonların lent diaqramı ilə göstərilmiş yuxarıdan görünüşü. Bu model kristal quruluşda görünməyən histon quyruqlarının uzunluğunu (nöqtəli xətlər) təsvir edir (bax Şəkil 8-24). H2A-nın N-sonluqlu quyruğu aşağıdadır, H2A-nın C-sonluqlu quyruğu isə yuxarıda göstərilir. H2B-nin N-sonluqlu quyruğu sağda və soldadır, H2B-nin C-sonluqlu quyruğu isə aşağıda ortadadır. Histon H3 və H4 modifikasiya olunmamış qısa C-sonluqlu quyruqlara malikdirlər. (b) İnsan histonlarının müşahidə olunmuş post-translyasiya modifikasiyalarının xülasəsi. Histon quyruğunun ardıcıllığı amin turşularının bir hərifli kodu ilə göstərilir (bax şəkil 2-14). Hər bir histonun əsas hissəsi oval şəkildə təsvir edilmişdir.Bu modifikasiyaların hamısı vahid bir histon molekulunda eyni vaxtda baş vermir. Əksinə, bu modifikasiyaların az bir hissəsinin xüsusi kombinasiyaları istənilən bir histonda müşahidə olunur. Bax K. Luger and T.J. Richmond, 1998, *Curr. Opin.Genet.Devel*. **8:**140. [(a) hissəsiverilənlər K.Luger et al., 1997, *Nature* **389**:251, PDB ID 1aoi.; (b) hissəsi verilənlər R. Margueron et al., 2005, *Curr. Opin.Genet.Devel*. **15**:163-dən.]

Bu ona görə belə düşünülür ki, repressiya olunan genə malik olan xromatin kondensasiya olunmuş quruluşda bükülür, bu da assosasiyada olan DNT-nin nukleaza tərəfindən əldə olunmasını sterk şəkildə ingibirləşdirir. Əksinə, transkripsiya olunan gen daha çox bükülməmiş xromatin ilə assosasiyada olur, bu da nukleazanın assosasiyada olan DNT-ni daha asan əldə etməsinə imkan verir. Ehtimal etmək olar ki, qeyri-eritroid hüceyrələrdə kondensasiya olunmuş xromatin quruluşu promotorun və DNT-də digər transkripsiyaya nəzarət ardıcıllıqlarının transkripsiya prosesinə daxil olan zülallar tərəfindən tutulmasını sterik şəkildə ingibirləşdirir və transkripsiyanın repressiyasına kömək edir (bax Fəsil 9).

Mayadakı genetik tədqiqatlar göstərdilər ki, histonlarda xüsusi lizin qalıqlarını asetilləşdirən *histon asetil transferzalar* (HAT-lar) çox genlərdə transkripsiyanın tam fəallaşması üçün tələb olunur. İndi məlumdur ki, histonlardan başqa bu fermentlər genlərin ekspressiyasına təsir edən başqa substratlara da malikdirlər. Nəticədə, onlar daha ümumi şəkildə *nüvə lizin asetil transferazalar* və ya KAT-lar kimi məlumdurlar, burada K amin turşusunun bir hərfli kodlaşdırılması ilə lizini bildirir (bax Şəkil 2-14). Əksinə, əvvəllər maya üzərində aparılmış genetik tədqiqatları göstərdi ki, çox maya genlərinin tam repressiyası, Fəsil 9-da müzakirə olunduğu kimi, histon quyruqlarında asetilləşmiş lizin qalıqlarından asetil qrupunu uzaqlaşdıran *histon deasetilazaların* (*HDAC-lar*) fəaliyyətini tələb edir.

Digər Histon Modifikasiyaları Şəkil 8-26b-də göstərildiyi kimi, xromatində histon quyruqları xüsusi amin turşuları nahiyyəsində bir sıra müxtəlif kovalent modifikasiyalara uğraya bilir. Lizin ε-amino qruplar metilləşə bilirlər, beləliklə asetilləşməyə mane olan bu proses onların müsbət yüklərini qoruyub saxlaya bilir. Bundan başqa, lizin ε-amino qruplarında N bir dəfə, iki dəfə və ya üç dəfə metilləşə bilir. Arginin yan zənciri də metilləşə bilir. Serinin və treoninin yan zəncirinin hidroksil qrupunda (-OH) O geriyə dönə bilən şəkildə fosforlaşaraq iki mənfi yükü daxil edir. Bu post-translyasiya modifikasiyalarının hər biri xromatinin bükülməsinə nəzarətdə iştirak edən, xromatinlə assosasiyada olan zülalların birləşməsində və DNT və RNT polimerazaların assosasiyada olduğu DNT-ni replikasiya və transkripsiya etmək qabliyyətində rol oynayır. Nəhayət sonda, 76-amin turşulu vahid ubikvitin molekulu geriyə dönə bilən şəkildə H2A və H2B-nin C-sonluqlu quyruğunda lizinə əlavə oluna bilir. Xatırladaq ki,

əlaqədə olan çox ubikvitin molekullarının zülallara əlavə olunması onları proteosomlarla deqradasiya üçün hazırlaya bilər (bax Şəkil 3-31). Amma, bu halda tək bir ubikvitin molekulunun əlavə olunması histonun stabilliyinə təsir etmir, hərçənd ki o xromatinin quruluşuna təsir edir.



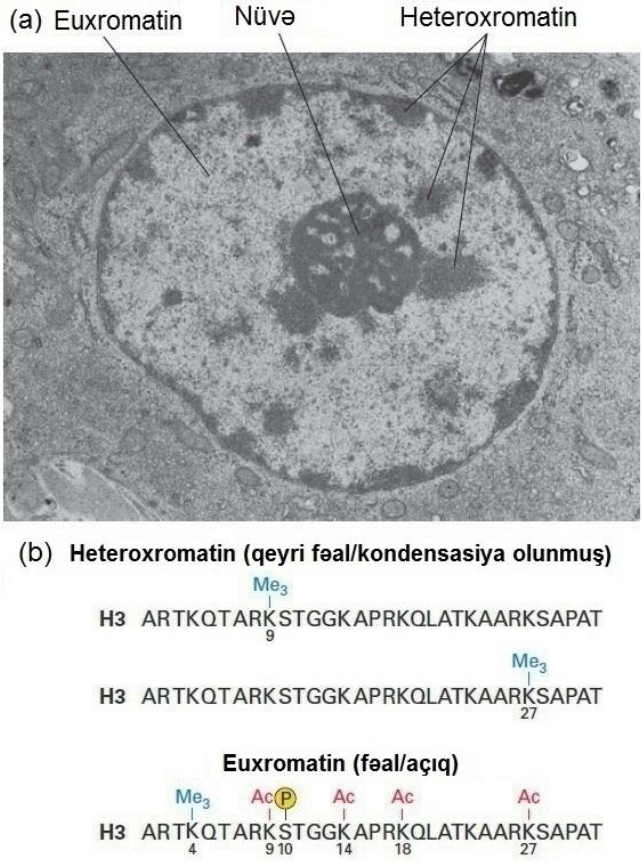
EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 8-27 Transkripsiya olunmayan genlər fəal genlərə nisbətən DN-aza I ilə doğranmaya çox az həssasdırlar. Cücənin 14 günlük rüşeyim eritroblastları fəal şəkildə qlobini sintez edirlər, halbuki cücənin differensasiya olunmamış limfoblast leykomiya (MSB) hüceyrələri sintez edə bilmirlər. (a) Hər iki tip hüceyrənin nüvəsi ayrılmış və DN-aza I-in yüksələn qatılığına məruz qoyulmuşdur. Sonra isə ondan nüvə DNT-si ayrılmış və DNT-ni qlobin ardıcıllığı yaxınlığında kəsən və normal halda 4.6 kə fraqmenti ayıran *Bam*HI restriksiya fermenti ilə təsir edilmişdir. (b) DN-aza I və *Bam*HI ilə doğranmış DNT, 4.6 kə *Bam*HI fraqmentə hibridləşən nişanlanmış klonlaşdırılan yetkin qlobin DNT problarla Sauzerin blottinq analizlərdə istifadə edilmişdir. Əgər qlobin geni ilkin DN-aza ilə doğranmaya həssasdırsa, o təkrar-təkrar doğranacaq və bu fraqmentin görünməsi gözlənilməyən olacaqdır. Sauzerin blottdan göründüyü kimi, qlobin sintez edın 14 günlük hüceyrələrdə transkripsiya olunmağa fəal olan DNT, nukleazanın yüksək qatılığında 4.6 kə bənd yox olunduğundan DN-aza I ilə doğranmağa həssas olmuşdur. Əksinə, MSB hüceyrələrdən alınan qeyri-fəal DNT doğranmaya qarşı dözümülü olmuşlar. Bu nəticələr göstərir ki, qeyri-fəal DNT xromatinin daha çox kondensasiya olunmuş formasındadır, ona görə də qlobin geni DNaza ilə doğranmaqdan mühafizə olunur. Bax J. Stalder et al., 1980, *Cell***19**:973; [(b) Elsevier-in razılığı ilə Stalder, J. et al., "Hb switching in chickens," *Cell,* 1980, **19**(4):973-80-dən yenidən çap olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc. vasitəsilə alınmışdır.]

Əvvəllər qeyd olunduğu kimi, xromatinin kondensasiyasının və ya kompaktlığının nəzarət olunmasına kömək edən, həmçinin onun transkripsiya, replikasiya və reparasiya olunması qabliyyəti histon quyruqlardakı modifikasiya olunmuş amin turşularının dəqiq kombinasiyasıdır. DNT-nin sıxılma dərəcəsini elektron mikroskopunda və işıq mikroskopu altında DNT birləşdirən rənglərdən istifadə etməklə müşahidə etmək olar. Xromatinin **heteroxromatin** kimi məlum olan kondensasiya olunmuş rayonu **euxromati**n kimi məlum olan, az kondensasiya olunmuş rayonuna nisbətən daha tünd rənglənir (Şəkil 8-28a). Növbəti mitoz zamanı heteroxromatin tam dekondensasiya olunmur, interfaza dövründə kompakt vəziyyətində qalır və bir qayda olaraq nüvə qabığı ilə, nüvəciklə və başqa mərkəzlərlə birləşmiş olur. Heteroxromatinə xromosomların sentromerləri və telomerləri, eləcə də transkripsiya üçün qeyri-fəal genlər daxildirlər. Əksinə, interfaza zamanı daha az kompakt vəziyyətdə olan euxromatinin sahələri DNT boyaları ilə yüngülcə rənglənir. DNT-nin transkripsiya olunan rayonlarının çoxu euxromatində tapılmışdır. Heteroxromatin adətən lizin 9-un metilləşməsi ilə modifikasiya olunmuş H3 histona malikdir, halbuki euxromatin əsasən geniş dərəcədə lizin 9-da və az dərəcədə digər H3 lizinlərdə asetilləşmiş H3 histona malik olur, o həmçinin lizin 4-ün metilləşməsinə və serin 10-un fosforlaşmasına da malik olur (Şəkil 8-28b). Heteroxromatində və euxromatində başqa histon quyruqları da fərqli spesifik modifikasiya olunmuşlar. Məsələn, H4 lizin 16 heteroxromatində asetilləşməmişdi və bu onlara imkan verir ki, qonşu nukleosomlarla qarşılıqlı əlaqədə olsun və xromatinin 30 nm liflərə bükülməsini stabilləşdirsin (bax Şəkil 8-25).

Histon Kodların Oxunması Histon quyruqlarında modifikasiya olunmuş amin turşularının histon kodu modifikasiya olunmuş quyruqlara birləşən və öz növbəsində xromotinin kondensasiyasını və dekondensasiyasını təşviq edən zülallarla "oxunur". Eukariotlar spesifik lizinlərdə metilləşən zaman histon quyruqlarına birləşən *xromodomen* adlanan domenə malik olan bir sıra zülalları ekspressiya edirlər. Bu zülalların bir nümunəsi olan *heteroxromatin zülal 1* (*HP1*) göstərmək olar. HP1 xromodomen H3 histonun N-sonluqlu quyruğuna onun yalnız lizin 9-da di- və ya trimetilləşməsi zamanı birləşir (bax Şəkil 8-28b). HP1 *xromokölgə* (*chromoshadow*) *domeni* adlanan ikinci domenə də malikdir, bu domen tez-tez hallarda xromodomenə malik olan zülallarda tapılır. Xromokölgə domen başqa xromokölgə domenlərə birləşir. Nəticədə, lizin 9-da di- və trimetilləşmiş H3 histona malik olan xromatin ($H3K9Me_{2/3}$) HP1 vasitəsi ilə kondensasiya olunmuş xromatin quruluşda yığılır, hərçənd ki, bu xromatinin quruluşu tam başa düşülməyib.

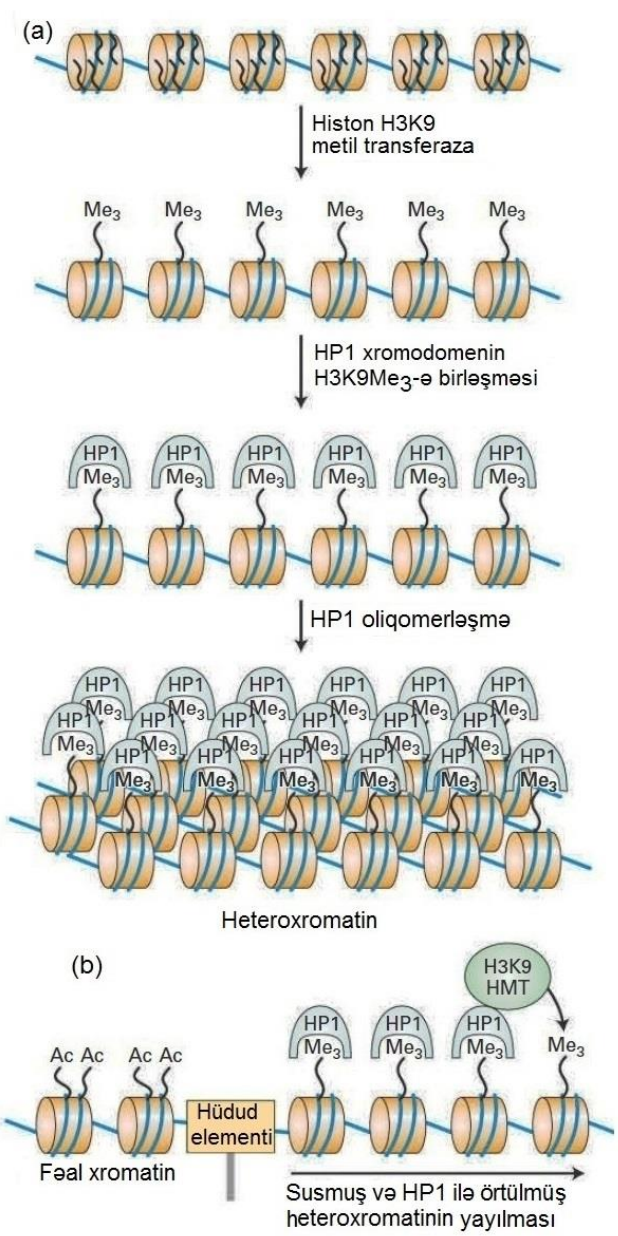
Özü-özünə birləşmədirməkdən başqa, HP1-in xromoşado domeni H3 lizin 9-u metilləşdirən H3K9 *histon metil transferaza* (*HMT*) fermenti də birləşdirir (Şəkil 8-29a). Nəticədə, HP1-ə malik olan heteroxromatin rayonuna yaxın (bitişik) olan nukleosomlar da lizin 9 qalığından metilləşmiş olurlar (Şəkil 8-29b). Bu metilləşmə digər HP1 üçün H3K9 histon metiltransferazanı birləşdirə bilən birləşmə saytını yaradır, nəticədə heteroxromatin quruluşunun xromosom boyu baş verən "səpələnməsi" səpələnmənin qarşısını alan *sərhəd elementləri* ilə rastlaşana qədər davam edir. Bu vaxta qədər xarakterizə

olunan sərhəd elementləri adətən bir neçə qeyri-histon zülallarının DNT-yə birləşdiyi xromatin rayonlarıdır və ola bilsin ki, sərhəddin digər tərəfində histon metilləşməsinin qarşısını alir.



ŞƏKİL 8-28 Euxromatinə qarşı heteroxromatin. (a) Sümük iliyinin sütun hüceyrələrinin bu elektron mikrofotosunda nüvədə (N) və nüvədən kənarda (N) tünd rənglənmiş zona heteroxromatindir. Zəif rənglənmiş, ağa-çalan zona euxromatindir. (b) Heteroxromatində və euxromatində histon N-sonluqlu quyruğun modifikasiyası burada histon H3 üçün göstərildiyi kimi fərqlənirlər. Xüsusən qeyd etməli ki, histon quyruqlar əsasən heteroxromatinlə müqayisədə euxromatində daha çox geniş asetilləşmişdir. Heteroxromatin daha çox kondensasiya olunmuşdur (beləliklə, zülallar üçün daha az əldə olunandır) və euxromatinə nisbətən transkripsiya üçün daha az fəaldır. [(a) hissəsi P.C. Cross and K.L. Merser 1993, *Cell and Tissue Ultrastructure*, W.H. Freeman and Company, p. 165; (b) hissəsi T/ Jenuwein and C.D. Alllis , 2001, *Science* **293**:1074 götürülmüşdir.]

Epigenetik yaddaş Əhəmiyyətlidir ki, Şəkil 8-29b-də verilmiş heteroxromatinin formalaşması modeli hüceyrə tsiklinin S fazasında DNT replikasiyasının ardınca xromosomların heteroxromatik rayonlarının yenidən necə bərpa olunmasının izahını verir. DNT heteroxromatində replikasiya edərkən, H3 lizin 9 di- və trimetilləşmiş vəziyyətdə olan histon oktamerlər yeni yığılmış histon oktamerlərlə birlikdə bərabər sayda hər iki qız xromosomlara paylanırlar. H3K9 di- və trimetilləşmiş nukleosomlarla assosasiyada olan H3K9 HMT yeni yığılmış nukleosomlarda lizin 9-u metilləşdirərək hər iki qız xromosomda heteroxromatrini regenerasiya edir. Nəticədə, heteroxromatin *epigenetik kodla* nişanlanır, bu ona görə belə adlandırılır ki, o replikasiya olunmuş qız hüceyrələrdə əlaqəli genlərin repressiyasını qoruyub saxlayan əsasların DNT-dəki ardıcıllığından asılı deyildir.



ŞƏKİL 8-29 HP1-in lizin 9-da trimetilləşmiş H3 histona birləşməsi ilə heteroxromatinin formalaşma modeli. (a) HP1 H3 histonin N-sonluqlu quyruğunda trimetilləşmiş lizin 9-a birləşərək heteroxromatinin kondensasiyasına kömək edir, sonra digər histona bağlı HP1 molekulları ilə əlaqə yaradır. (b) Heterochromatinin kondensasiyası xromatin boyu səpələnə bilir, çünki HP1 histon H3-də lizin 9-u metilləşdirən histon methyltransferaza (HMT) ilə birləşir. Bu HP1 üçün qonşu nukleosomda birləşmə saytını yaradır. Səpələnmə prosesi "birləşmə elementləri" rast gəlinənə qədər davam edir. Bax G. Theil et al., 2004, *Eur. Jor, Biochemistry***271**:2855, və A.J. Bannister et al., 2001, *Nature***410**:120 götürülüb.

Histon quyruqlarının modifikasiyası ilə bağlı olan başqa zülal domenləri xromatin üçün tipikdir. Məsələn, *bromodomen* asetilləşmiş histon quyruqlarına birləşir, ona görə də transkripsiyaya görə fəal olan xromatinlə assosasiya girir. Gen transkripsiyasının stimullaşmasına daxil olan bir sıra zülallar TFIID-nin böyük domeni kimi homeodomenlərə malikdirlər (bax Fəsil 9). Bu *transkripsiya faktoru* bir-birinə çox yaxın yerləşmiş homeodomenlərə malikdir, yəqin ki, bunlar TFIID-in transkripsiya görə fəal xromatinlə (euxromatinlə) birləşməsinə kömək edir. Bu zülal və homoeodomenə malik olan başqa zülallar da həmçinin histonasetilaza fəallığına malik olurlar, bu da onlara xromatini transkripsiyanın keçirilməsi üçün hiperasetilləşmiş vəziyyətdə saxlamağa kömək edir. Nəticədə, euxromatinlə bağlı olan epigenetik kod ardıcıl hüceyrə bölünməsi yolu ilə euxromatində genlərin transkripsiya fəallığının saxlanmasına kömək edir. Heteroxromatin və euxromatin üçün olan bu epigenetik kodlar, embrional inkişafın erkən dövründə, differensasiya olunmuş spesifik hüceyrə tipləri hüceyrə bölünməsi yolu ilə artarkən, müxtəlif hüceyrə tiplərində yaranmış gen ekspressiyasının profilini qoruyub saxlamağa kömək edir. Qeyd etmək əhəmiyyətlidir ki, epigenetik kodlardakı anormal dəyişikliklərin xərçəng hüceyrələrinin patogen replikasiyasına və davranışına kömək etdiyi aşkar olunmuşdur (bax Fəsil 24).

Beləliklə, histon quyruqlarının kovalent modifikasiyasının çoxsaylı tipləri nukleosom-nukleosom qarşılıqlı əlaqələrini və DNT-nin replikasiyası və transkripsiyası proseslərində və bu proseslərin tənzimlənməsində iştirak edən əlavə zülallarla qarşılıqlı əlaqələri dəyişməklə xromatinin quruluşuna təsir edə bilir. Transkripsiyanın tənzimlənməsində xromatin modifikasiyasını idarə edən mexanizm və molekulyar proseslər növbəti fəsildə geniş müzakirə olunur.

Məməlilərin Dişi Fərdlərində X-xromosomun Fəalsızlaşması

Heteroxromatinin repressiyası yolu ilə genlərin epigenetik nəzarətinin bir əhəmiyyətli nümunəsi dişi məməlilərdə iki X xromosomdan birinin nizamsız kondensasiyası və fəalsızlaşmasıdır. Məməlilərin hər bir dişi fərdi iki X xromosoma malik olur, bunlardan biri inkişaf etdikləri yumurtadan alınır (X_m), digəri isə spermadan alınır (X_p). Rüşeyimin erkən inkişaf dövründə X_m və ya X_p xromosomlardan birinin nizamsız fəalsızlaşması bütün somatik hüceyrələrdə baş verir. Dişi embrionlarda təxminən hüceyrələrin yarısı qeyri-fəal X_m və digər yarısı isə qeyri-fəal X_p malik olurlar. Sonra yaranan bütün qız hüceyrələr öz valideyin hüceyrəsi kimi eyni qeyr-fəal X xromosomları əldə edəcəkdir. Nəticə etibarı ilə yetkin dişi fərdlərin bəziləri genləri X_m-dən ekspressiya edərək, bəziləri isə genləri X_p-dən ekspressiya edərək mozaik klona malik olacaqlar. Dişi məməlilərdə X xromosomun birinin fəalsızlaşması *doza kompensasiyası* ilə nəticələnir, bu proses dişi fərdlərin hüceyrələrinə X xromosomlarda kodlaşdırılan zülalların bir X xromosoma malik olan erkək fərdlərin hüceyrələri kimi eyni səviyyədə (miqdarda) ekspressiyasını təmin edir.

Qeyri-fəal X xromosomla birləşən histonlar heteroxromatinin digər rayonlarına xarakterik olan post-translyasiya modifikasiyasına: lizin qalıqlarının hiperasetilləşməsinə, histon H3 lizin 9-da di- və tri-metilləşməyə, H3 lizin 27-nin tri-metilləşməsinə və histon H3 lizin 4-də metilləşmənin olmamasına malik olurlar (bax Şəkil 8-28b). Embrional inkişafın erkən dövründə X-xromosomun fəalsızlaşması iki X xromosomlardan hansının fəalsızlaşacağını və hansı hüceyrədə fəalsızlaşacağını təyin edən, X xromosom üzərindəki kompleks lokus olan X-inaktivasiya (fəalsızlaşma) mərkəzi tərəfindən tənzimlənir. X-falsızlaşma mərkəzi həmçinin transkripsiya olunduğu X xromosomu örtən və bununla da xomosomun susmasına səbəb olan kifayət qədər uzun, zülal kodlaşdırmayan RNT-ni kodlaşdıran *XIST* genə malikdir.

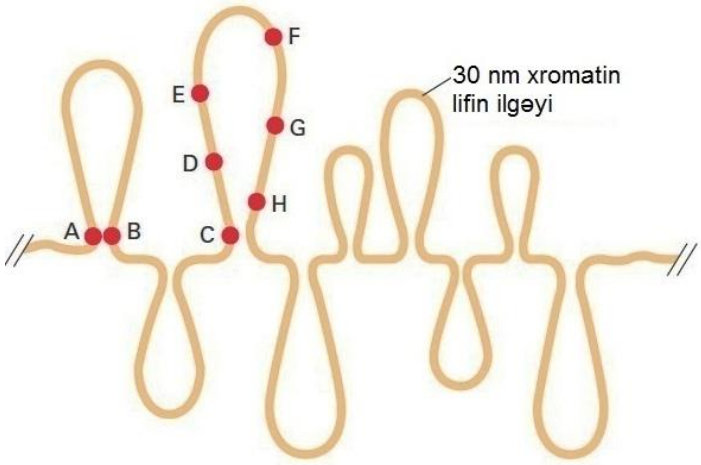
Baxmayaraq ki, X-xromosom fəalsızlaşmasının mexanizmi tam aydın deyildir, o bir neçə prosesi, o cümlədən Fəsil 9-da müzakirə olunan *Polikomb* zülal komplekslərinin təsirini özündə cəmləyir. Polikomb kompleksin subvahidlərindən biri, H3 histon quyruqlarının lizin 27 qalığı tri-metilləşərkən ona birləşən xromodomenə malikdir. Polikomb kompleks həmçinin H3 lizin 27-yə spesifik olan histon metiltransferazaya malikdir. Bu tapıntı X-fəalsızlaşma prosesinin X xromosomun böyük rayonları boyunca necə yayıldığını və onun, DNT replikasiyası yolu ilə necə saxlanıldığını, HP1-in lizin 9-da metilləşmiş H3 histon quyruğuna birləşməsilə heteroxromatinləşmədə olduğu kimi izah etməyə kömək edir (bax Şəkil 8-29b).

X-romosomun fəalsızlaşması epigenetik proseslərin başqa bir nümunəsidir, bu spesifik genlərin ekspressiyasına təsir edən prosesdir və qız hüceyrələrlə irsən nəsilə ötürülür, amma o DNT ardıcıllığındakı dəyişilmələrin nəticəsi deyil. Başqa sözlə, dişi məməlilərdə X xromosomda genlərin fəallığına mövcud olan DNT ardıcıllığından daha çox xromatin quruluşu vasitəsi ilə nəzarət olunur. Həmçinin fəalsızlaşmış X xromosom (X_m və ya X_p) bütün hüceyrə bölünmələrində gələcək nəsil hüceyrələr üçün qeyri-fəal xromosom kimi qorunub saxlanılır, çünki bu histonlar spesifik, repressiyaedici tərzdə modifukasiya olunurlar, bu isə dürüst şəkildə hüceyrə bölünmələri zamanı irsən nəsilə ötürülür.

Qeyri-histon Zülallar Uzun Xromatin İlgəklərini Təşkil Edirlər

Hston zülalları xromatində dominantlıq edən zülallar olsalarda, az zənginliyə malik olan, xromatinlə assosasiyada olan qeyri-histon zülallar və DNT molekulunun özü xromosomun quruluşu üçün kritik əhəmiyyət kəsb edir. Son zamanların nəticələri göstərir ki, metafaza xromosomuna onun quruluşunu verən tək zülallar deyil. Proteazaların və ya nukleazaların iştirakı ilə Tritonunn çox böyük metafaza xromosomlarının makromexaniki tədqiqatları göstərdi ki, onun uclarından dartılan zaman metafaza xromosomunun mexaniki bütövlüyünn saxlanılmasına zülallar deyil, DNT cavabdehdir. Bu nəticələr xromosom oxunda davamlı (fasiləsiz) zülal skafoldu ilə ziddiyət təşkil edir. Daha doğrusu xromosom quruluşunun bütövlüyü DNT-nin, histon oktamerlərin və xromatin-assosasiyalı qeyri-histon zülalların tam xromatin kompleksini tələb edir.

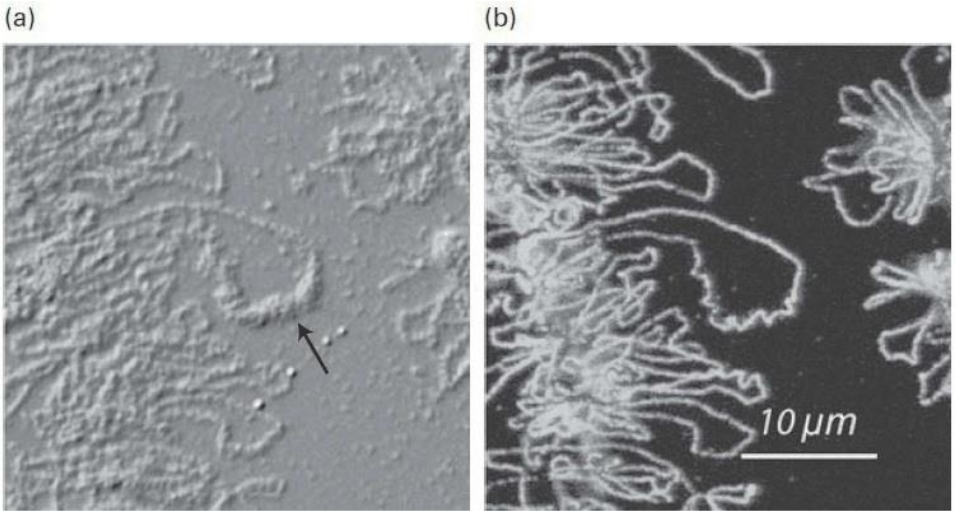
İnsanın interfaza hüceyrələrinin xromosomlarından birində DNT-nin bir neçə müxtəlif fluoressent-nişanlanmış problarla in situ hibridləşmə eksperimentləri xromatinin böyük ilgəklər şəkilində təşkil olunduğu modeli dəstəkləyir. Bu eksperimentlərdə xətti DNT-də bir-birindəm millionlarla əsas cütü məsafədə ayrılmış bəzi ardıcıllıqların interfaza nüvəsində bir-birinə çox yaxın yerləşdikləri aşkar olmuşdur (Şəkil 8-30).



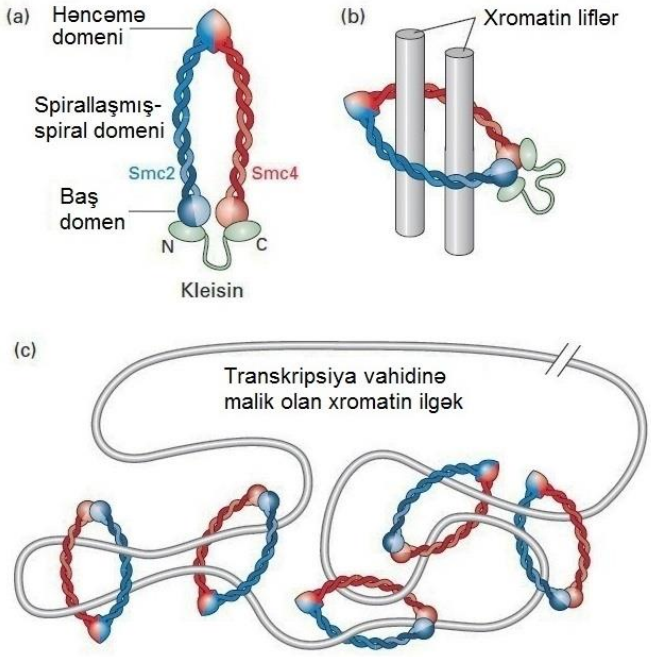
EKSPERIMENTAL ŞƏKİL 8-30 İnterfaza xromosomu ilə hibridləşmiş fluoressent-nişanlanmış problar xromatin ilgəkləri göstərir və onların ölçülməsinə imkan yaradır. İnterfaza hüceyrələrinin in situ hibridləşməsi klonlaşdırılmış xətti DNT-də məlum olan məsafələrdə ayrılmış ardıcıllıqlara spesifik olan bir neçə fərqli problarla həyata keçirilmişdir. Hərflərlə göstərilmiş dairələr probları təmsil edir. Rənglərinə görə fərqləndirilə bilən müxtəlif hibridləşmiş problar arasında məsafələrin ölçülməsi göstərir ki, bir-birindən million əsas cütləri ilə ayrılmış bəzi ardıcıllıqlar (məsələn A və B) nüvə daxilində bir-birinə daha yaxın yerləşmişlər. Bəzi ardıcıllıq dəstləri üçün nüvədə bir prob (məsələn, C) və ardıcıl olaraq uzaqlaşan ardıcıllıqlar arasında ölçülən məsafə əvvəlcə artır (məsələn, D, E və F) sonra isə azalır (məsələn, G və H) Bax H. Yokota et al., 1995, *J.Cell Biol*.**130**:1239.

Belə hesab olunur ki, bir-birinə çox yaxın yerləşmiş bu prob saytlar xromatin ilgəklərin əsasında durur. Xromatin ilgəkləri böyüməkdə olan amfibiaların oositlərinin fəal xromatinində ("fırça chromosomlar") işıq mikroskopu ilə də birbaşa vizuallaşdırıla bilir (Şəkil 8-31). Bu hüceyrələr başqa hüceyrələrin əksəriyyəti ilə müqayisədə hədsiz dərəcədə böyükdürlər (~1 mm diametrdə), ona görə ki, onlar mayalanmış yumurta hüceyrəsinin əlavə qida maddələrini qəbul edə bilən qidalandırıcı embrionunu yaratmaq üçün, tələb olunan minlərlə differensasiya olunmuş hüceyrələrə bölünərkən lazım olan bütün sitoplazmatik və nüvə materiallarının ehtiyatlarını yığırlar. Amfibiaların nüvəsi əksər onurğalıların somatik hüceyrəsinin diametrindən 50 dəfə böyükdür. Bu hüceyrələrdə xromatin sıx assosasiyada olan nüvə qabığı ilə məhdudlaşmır, əksinə onlar məməlilərin somatik hüceyrələrindən 10^5 dəfə böyük həcimdə olan nukleoplazmada "üzürlər". Bu hüceyrələrdə RNT polimeraza II anticismi ilə boyanmış xromatinin mikroskopiyası xromatinin yüksək dərəcədə kondensasiya olunmuş, transkripsiyaya görə qeyri-fəal mərkəzi özəyindən uzanan polimeraza ilə sıx şəkildə bükülmüş uzun ilgəklərini göstərir. Aşağıda müzakirə olunduğu kimi, ilgəklər öz əsaslarında xromosomun tam uzunluğu boyu uzanan dupleks DNT molekulunu qırmayan mexanizmlə bağlanırlar.

SMC Zülal Komplekslərin Dairəşəkilli Quruluşu İnterfaza xomosomlarında xromatin ilgəklərin əsası (bax Şəkil 8-30) ola bilsin ki, **xromosom quruluşunun qorunub saxlanması (SMC – structural maintenance of chromosome)** adlanan zülallarla yerində həyata keçirilə bilir. Bu qeyri-histon zülallar mitoz zamanı kondensasiya olunmuş xromosomların morfoloji quruluşunun qorunub saxlanması üçün kritik əhəmiyyətə malikdir. *Xenopus laevus* (Afrika qurbağası) yumurtalarının böyük nüvəsindən hazırlanmış ekstraktlarda xromosomlar kondensasiya olunmaq üçün induksiya oluna bilər, necə ki, onlar intakt hüceyrələrdə mitoz zamanı profazaya keçərkən kondensasiya olunurlar. Bela kondensasiya SMC zülallardan bir tipinin spesifik anticismlərlə ekstraktdan uzaqlaşdırılması zamanı baş tutmur. Maya hüceyrələrində SMC zülallarının müəyyən mutasiyası hüceyrə tsiklinin S fazasında DNT replikasiyasının ardınca qız xromatidlərin düzgün assosasiyası baş tutmur. Nəticədə, mitoz zamanı xromosomlar qız hüceyrələrə düzgün seqreqasiya etmirlər. Bakteriya və arxeyalarda da xromosomların düzgün seqreqasiyası üçün uyğun SMC zülalları tələb olunur, bu göstərir ki, bunlar bütün canlılar aləmində xromosomların quruluşu və seqreqasiyası üçün həyati əhəmiyyətə malik olan qədim zülallar sinifinə daxildir.

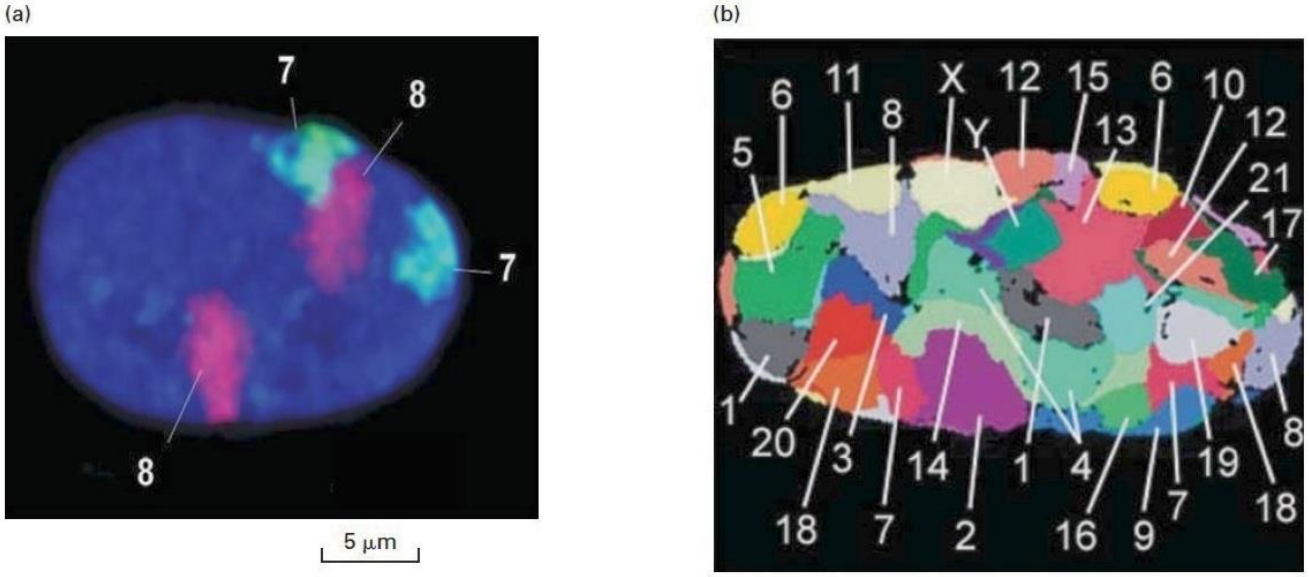


EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 8-31 Fırça xromosomunda xromatin ilgəkləri. Fırça xromosomun qısa seqmenti *Notophthalmus viridescens* tritonun oositinin nüvəsində. (a) Fırça xromosomun bir hissəsinin və hnRNP zülallarla (oxlar, bax Fəsil 10) assosasiya edən transkripsiya olunan RNT ilgəyin differensial interenferensiya kontrast (DIC) mikroskopiyası. (b) Eyni sahə RNT polimeraza II-spesifik anticismlə boyandıqdan sonra immunofluoressensiya ilə müşahidə olunmuşdur. [Elsevier razılığı ilə Gall, J.G. et al., "Structure in the amphibian germinal vesicle," *Exp. Cell Res.*, 2004, **296**(1):28-34-dən yenidən çap olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc. vasitəsilə alınmışdır.]



ŞƏKİL 8-32 Xromatinə birləşmiş SMC kompleksinin modeli. (a) SMC zülal kompleksinin modeli. (b) İki 30 nm xromatin liflərini (silindir şəkilində göstərilir) topoloji əlaqələndirən SMC kompleksinin modeli. (c) SMC kompleksin transkripsiya olunan xromatin ilgəyinin əsasına birləşməsi modeli. Bax K. Nasmith and C.H. Haering, 2005, *Ann.Rev.Biochem*. **74**:595.

Hər bir SMC monomer asılqana bənzər rayona malikdir, bu rayonda polipeptid geriyə, özünə tərəf qatlanaraq və çox uzun spirallaşmış spiral rayonunu formalaşdıraraq N- və C-sonluqları bir yerə gətirir, onlar da qarşılıqlı təsirdə olaraq qlobulyar "baş" domeni yaradırlar (Şəkil 8-32a). Bir monomerin asılqan domeni (Şəlkil 8-32-də mavi) ikinci monomerin asılqan domeninə (qırmızı) birləşir və demək olar ki U şəkilli dimer kompleksi yaradır. Monomerlərin baş domeni ATP-aza fəallığına malikdir və *kleisinlə*r adlanan digər kiçik zülallar ailəsinin nümayəndələri ilə əlaqəlidirlər. Ümumilikdə SMC kompleksi iki 30 nm xromatin liflərini yerləşdirmək üçün kifayət qədər böyük diametrdə olan bir dairədir (Şəkil 8-32b) və iki dairəvi DNT molekullarını bir-biri ilə in vitro əlaqələndirmək qabliyyətindədir. Güman olunur ki, SMC zülallar Şəkil 8-32c-dəki diaqramda verildiyi kimi 30 nm xromatin liflərində topoloji cəhətdən məcburi düyünləri formalaşdırmaqla xromatin ilgəklərinin əsasını yaradırlar. Bu model nəyə görə nisbətən az miqdarda saytlarda DNT-nin kəsilməsinin kondensasiya olunmuş metafaza xromosom quruluşunun çox tez pozulmasına səbəb olduğunu izah edə bilir, halbuki zülalların proteazalarla parçalanması zülalların çox hissəsinin dağılmasına qədərki müddətdə xromosomun quruluşuna az təsir göstərir. Xromatinin bir neçə xromatin ilgəklərinə malik olduğu uzun rayonunda DNT istənilən yerdən kəsilərkən kəsilmiş uclar SMC zülal halqada sürüşərək xromatin ilgəklərini bir yerdə saxlamağa məcbur edən topoloji düyünləri "açır". Əksinə SMC zülalların fərdi halqalarının əksəriyyəti ilgəkləri əmələ gətirən əsasları bir yerdə saxlayan topoloji məhdudiyyətlər buraxılmazdan əvvəl qırılmalıdır.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 8-33 İnterfaza dövründə insan xromosomları nüvədə üst-üstə düşməyən ərazilərdə qalırlar. İnsanın sabit interfaza fibroblastları insanın 7-ci (göy) və 8-ci (bənövşəyi) xromosomlarının tam uzunluqları boyunca ardıcıllıqlara spesifik olan fluoressent nişanlanmış problarla in situ hibridləşmişdir. DNT DAPI ilə göy rənglənmişdir. Diploid hüceyrələrdə iki xromosom 7-nin və iki xromosom 8-in hər biri bütün nüvə boyu uzanmaqdansa nüvə daxilində müəyyən ərazidə və ya domendə məhdudlaşırlar. (b) Bu təsvir insanın kişi fərdinin fiksə olunmuş interfaza fibroblastında (a)-da istifadə olunan metodla edilmişdir, istisna odur ki, hər bir xromosoma spesifik olan xromosom rəngləmə probları bütün xromosomların yerini aşkar etmək üçün hüceyrəyə hibridləşdirilmişdir. Xromosomlardan bəziləri nüvənin bu konfokal kəsiklərində müşahidə edilmədi.[(a) hissəsi nəzakətlə Dr Irina Solovyev tərəfindən verilmişdir. (b) hissəsi A. Bolzer et al., 2005,Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol.PLOS Biol***3**:826.]

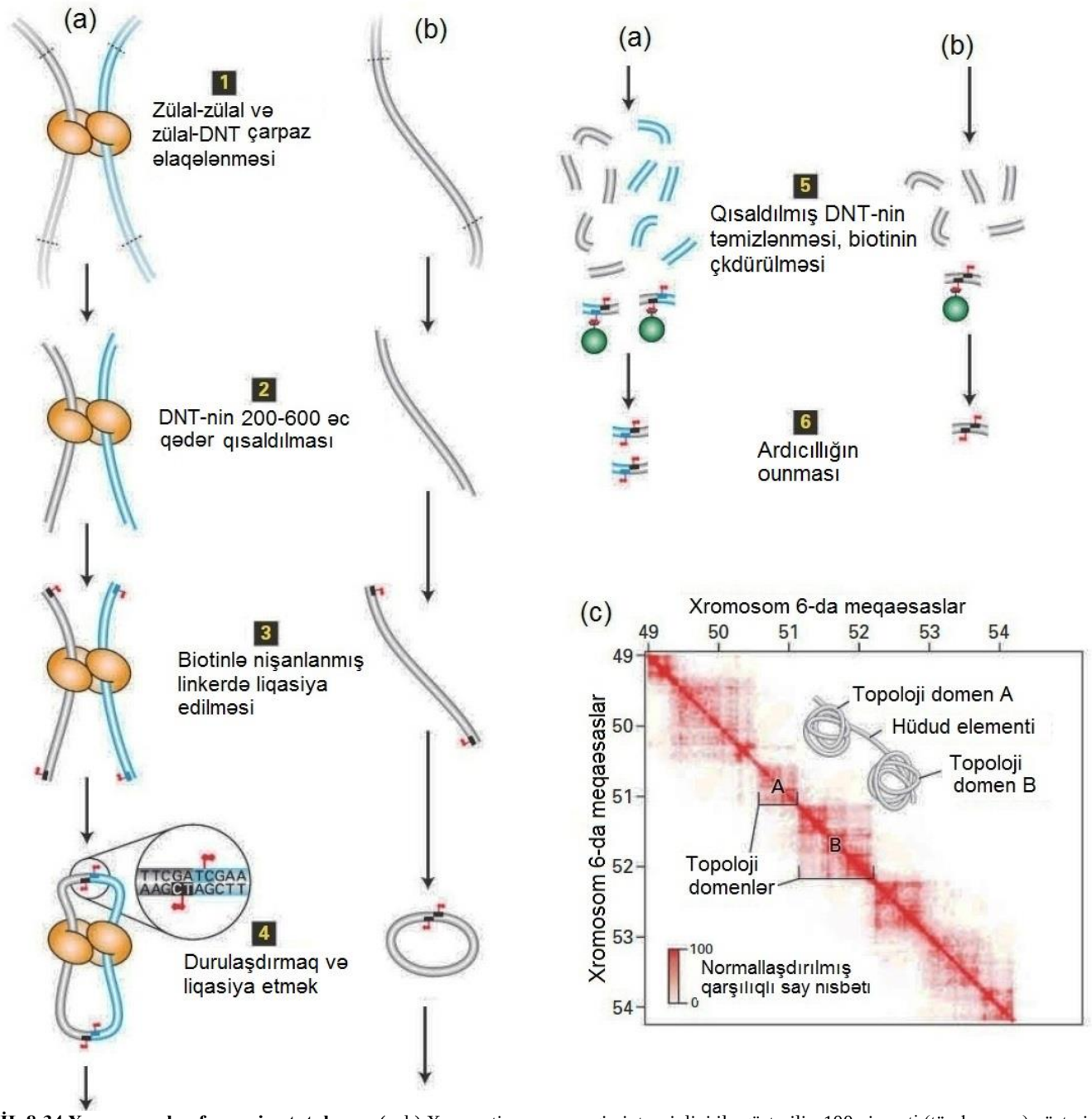
İnterfaza Xromosom Əraziləri Hüceyrələrin əksəriyyətinin kiçik nüvəsində metafaza xromosomlarına nisbətən az kondensasiya olunmuş fərdi interfaza xromosomları standart mikroskopiya və ya elektron mikroskopiyası ilə aşkar edilə bilməz. Bununla belə interfaza hüceyrəsində bir xromosomun xromatini bütün nüvə boyu yayılmamışdır. Əksinə, interfaza xromatini *xromosom ərazilərində* təşkil olunmuşdur (düzlənmişdir). Şəkil 8-33-də göstərildiyi kimi, xromosom-spesifik fluoressent-nişanlanmış problarla interfaza nüvəsinin in situ hibridləşməsi göstərir ki, problar bütün nüvə boyu deyil, məhz nüvənin məhdud rayonları daxilində görünürlər. Müxtəlif xromosomlara spesifik olan probların istifadə olunması interfaza nüvəsində xromosomların bir-birini örtməsinin çox az olduğunu göstərdi. Xromosomların dəqiq mövqeləri hüceyrələr arasında təkrarlanmazdır, hərçənd ki, böyük xromosomlar nüvənin kənarlarında, kiçik xromosomlar isə nüvə mərkəzinə doğru uzanırlar. Həmçinin, *nüvəcik təşkilatçıları* kimi məlum olan, 13, 14, 15, 21 və 22-ci xromosomlarda üzərində rRNT-nin transkripsiya vahidlərinin təkrarlanması nüvənin mərkəzi yaxınlığında tapılmış nüvəciklə bağlıdır.

Xromosom Əraziləri Daxilində Topoloji Domenlər *Xromosom konformasiya tutulması* ("3C") metodları kimi məlum olan yaxın metodlar qrupu kütləvi parallel DNT ardıcıllığının oxunmasının meydana gəlməsi və on millionlarla 50-100-əc uzunluqda DNT fraqmentlərinin ardıcıllığının oxunması ilə mümkün edilmişdir (bax Fəsil 6). Bu metodların məqsədsi interfaza hüceyrələrində nüvə daxilində xromatinin üçölçülü fəza konformasiyasının təşkilini təyin etməkdir. İnsanın intefaza hüceyrələrində təxminən 2 m uzunluqda olan DNT yalnız təxminən 20 μm diametrdə olan nüvə daxilində yerləşmək üçün bükülür və yenidən bükülür. Xromosom konformasiyasının tutulmasının əsas strategiyası Şəkil 8-34-də təsvir edilmişdir, burada xromatinin uzaq rayonları arasındakı assosasiya (a)-da təsvir edilir, xromatinin başqa rayonları ilə spesifik assosasiya etməyən rayonları (b)-də göstərilir. Birincisi (pillə **1**) intakt hüceyrələr hüceyrə membranından diffuziya edib keçən və zülalı-zülala və zülalı-DNT-yə çarpaz bağlayan formaldehid kimi kimyəvi-çarpaz birləşdiricilərlə işlənilir. Sonra **2** çarpaz birləşmiş xromatin ayırılmış və 200-600 əc uzunluqda fraqmentlərə parçalamaq üçün ya restriksiya fermenti ilə doğranmış ya da intensiv mexaniki sonikasiyaya məruz qoyulmuşdur. **3** Qısa oliqonukleotid linkerlər sonra DNT fraqmentlərinin uclarına liqasiya olundular. Bu linkerlər 5′ mövqeyində biotinə bağlanmış sitozinə malikdirlər (bax Şəkil 2-17). **4** Linkerlərin artıq hissəsi uzaqlaşdırıldıqdan sonra preparat əhəmiyyətli dərəcədə durulaşdırıldı və DNT liqaza ilə işlənməyə məruz qoyuldu. Preparat durulaşdırıldığından liqasiya kross-linklə daha yaxın məsafədə yerləşən fraqmentlərin ucları arasında daha böyük üstünlüklə baş verdi. **5** Liqasiyadan sonra zülal-DNT kross-link reaksiyası geriyə dönür, zülal proteazalarla dağıdılır və DNT ayırılaraq daha da sonikasiya edilir. Liqasiya olunmuş fraqmentər pillə **3**-də əlavə edilmiş linkerdəki biotinə birləşən streptavidindən istifadə etməklə başqa fraqmentlərdən ayırılır.

Sonra təmizlənmiş liqasiya olunan fraqmentlərin ardıcıllığı oxunur. Liqasiya nöqtələri oliqonukleotid linkerin ikiləşmiş ardıcıllıqları ilə nişanlanır (bax Şəkil 8-34, pillə **4**). Liqasiya nöqtəsinin hər iki tərəfində ardıcıllıqlar genoma xəritələşdirilir. Bir fraqmentlərin iki ucunun bir yerə bağlandığı hallarda (Şıkil 8-34b) liqasiya olunmuş fraqmentlər bir neçə yüz əsas uzunluğunda olduğundan oliqonukleotid linker ardıcıllığın hər iki tərəfindəki ardıcıllıqlar genomda bir-birindən bir neçə yüz əsas məsafə daxilində xəritələşəcək. Amma genom ardıcıllığında bir-birindən uzaq məsafədə olan fraqmentlərin onları bir yerdə saxlayan zülallarla çarpaz bağlanmalarına görə bir yerə liqasiya olunduqları halda (Şəkil 8-34a) bu ardıcıllıqlar bir-birindən uzaqda xəritələşəcəklər. Təkrar-təkrar bir-birinə liqasiya olunmuş uzaq məsafədəki (>10 kə) ardıcıllıqların müşahidəsi göstərir ki, onların xromatindəki müvafiq rayonu bir-biri ilə in vivo assosasiyada olurlar.

Xromatin konformasiya tutulması sınaqlarından alınan nəticələr ikiölçülü istilik xəritəsində tərtib edilə bilər (Şəkil 8-34c). Bu qrafikdə genomun eyni hissəsinin ardıcıllığı *x* və *y* oxları üzərində tərtib edilmişdir və hər bir piksel 10 kə ardıcıllığa uyğundur. *x* və *y* koordinatlarında piksel qırmızı rənglənmişdir, burada *x* koordinatındakı ardıcıllıq *y* koordinatındakı ardıcıllığa liqasiya olunmuşdur. Qırmızı rəngin intensivliyi müşahidə olunan liqasiya hadisələrinin sayına mütənasibdir, bu 10 kə intervaldakı *x* ardıcıllığı 10 kə intervaldakı *y* ardıcıllıqla liqasiya edir.

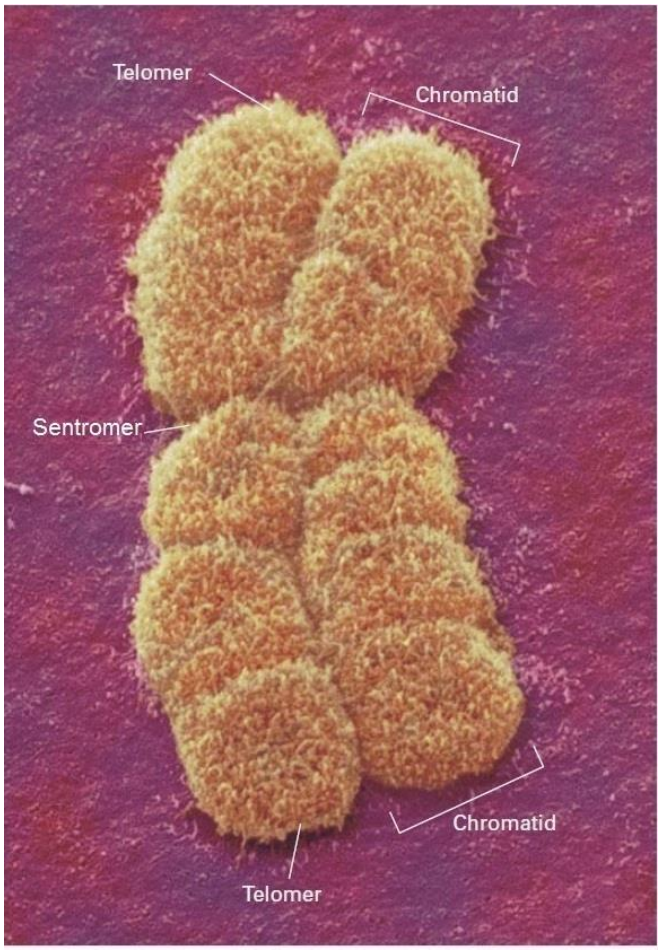
Şəkil 8-34 siçan embrionunun sütun hüceyrələrində xromosom 6-nın təxminən 5.5 Mə rayonu üçün yaradılmış qrafiki göstərir. Buradan dərhal görünür ki, genom *topoloji domenlər* adlanan rayonlara bölünür və xromosom rayonu böyük ehtimalla başqa topoloji domendəki ardıcıllıqla deyil, eyni topoloji domen daxilində olan başqa ardıcıllıqla liqasiya olunur. Topoloji domenlər orta ölçüsü 880 kə uzunluqda olan 200 kə-dan 1.5 Mə uzunluğa qədərdir. Məsələn, xromosom 6-da 50.9 Mə-dan 51.3 Mə-a qədər intervaldakı ardıcıllıqlar (bax Şəkil 8-34c, topoloji domen A) çox böyük ehtimalla 51.3 Mə dan 52.2 Mə-a qədər (topoloji domen B) intervalda olan ardıcıllıqlarla və ya tamam başqa topoloji domenlərdə olan ardıcıllıqlarla deyil öz aralarında liqasiya olunurlar. In situ hibridləşmə tədqiqatları göstərdi ki, topoloji domen daxilindəki ardıcıllıqlar verilmiş hüceyrə nüvəsi daxilində eyni əsas cütləri məsafədə, amma qonşu topoloji domendə olan ardıcıllıqlara nisbətən bir-birinə daha çox yaxın yerləşirlər. Bu nəticələr n Şəkil 8-34c-də əlavədə təsvir edildiyi kimi, xromatin lifini topoloji domenlərdə büküldüyünü göstərmək kimi şərh edilmişdir. Topoloji domenlər xromatinin uzaq rayonları ilə qarşılıqlı təsirə girməyən, *hüdud elementləri* adlanan qısa xromatin rayonları ilə ayrılırlar. Topoloji domenlər 200 kə-dan 1.5 Mə qədər uzunluqda olduğundan onlar orta ölçülü bir neçə genə malik olacaq qədər uzun olurlar. Bu xromatin konformasiya tutulması analizləri ilə identifikasiya olunan topoloji domenlər çox kiçik nüvələrdə nüvə qabığı ilə məhdudlaşmayan və bükülməsi açıla bilmək imkanına malik olan (bax Şəkil 8-31) yuxarıda təsvir edilmiş fırça xromosomlarda müşahidə olunan xromatin ilgəklərinə uyğun gələ bilər. Hazırkı tədqiqatlar hansı zülal-DNT qarşılıqlı əlaqələrinin topoloji domenlər arasındakı sərhəd elementlərinin yaranmasında cavabdeh ola biləcəyini öyrənir. Bizim Fəsil 9-da görəcəyimiz kimi, oxşar xromosom konformasiya tutulması metodları enhanserlərə birləşmiş zülalların bir çox kiloəsas uzaqda yerləşən promotorlara birləşmiş zülallarla qarşılıqlı təsirini sübut edən çox güclü dəlilləri təmin edir.



ŞƏKİL 8-34 Xromosom konformasiya tutulması. (a, b) Xromoatin konformasiya tutulması metodunun strategiyası. İzah üçün tekstə bax. Boz və mavi borucuqlar genom ardıcıllığında >10 kə ayrılmış DNT rayonlarını təmsil edir. Biotin qırmızı bayraqlarla təmsil edilir. Bax E. Liberman-Aiden, 2009, *Science***326**:289. (c) Siçanın embrional sütun hüceyrələrində xromosom 6-nın rayonları üçün xromosom konformasiya tutulması nəticələrinin istilik xəritəsi. Xromosom 6-nın sol ucunda 49-dan 54-cü Mə qədər ardıcıllıq hər iki aksis oxunda təmsil edilir. Hər bir piksel 10 kə ardıcıllığın nəticələrini göstərir. Aşağıda sol tərəfdə olan açarda göstərildiyi kimi, *x* oxunda göstərilən bir 10 kə-lıq rayondan olan ardıcıllığın *y* oxunda göstərilən ikinci 10 kə-lıq rayondan olan ardıcıllıqla liqasiyasının dəfələrlə sayı qırmızı rəngin intensivliyi ilə göstərilir. 100 qiyməti (tünd qırmzı) göstərir ki, *x* oxu üzərindəki 10 kə rayon daxilində istənilən yerdəki ardıcıllıq *y* oxu üzərindəki ikinci 10 kə rayonun istənilən yerindəki ardıcıllıqla 100 dəfə liqasiya olunmuşdur. Ultrasəs sonikasiya nəticəsində yaradılan iki ucun bir yerə liqasiya olunma ehtimalı daha uzaqda olan uclara nisbətən, bir-birinə yaxın olan uclar üçün yuxarı olduğundan, istənilən pikseldə qırmızı rəngin intensivliyi nüvədə çarpaz əlaqələnmə zamanı iki 10 kə intervallardakı ardıcıllıqların nisbi yaxınlığını göstərir. Əlavə bu nəticələrlə uzlaşan xromatin qatlanması modelini göstərir. [(c) hissəsi J. R. Dixon, 2012, *Nature* **485**:376-dan.]

Metafaza Xromosomunun Quruluşu Profaza zamanı xromosomların kondensasiyası (bax Şəkil 18-37) xromatində çoxsaylı yeni ilgəklərin yaranmasına səbəb ola bilir, beləliklə hər bir ilgəyin uzunluğu interfaza hüceyrələrindəki ilgəklərin

uzunluğu ilə müqayisədə güclü şəkildə qısalır. Nəticədə xromosom interfaza xromosomu ilə müqayisədə daha böyük quruluşlara kondensasiya olunur və uzunluğu bir neçə dəfə qısalır, metafaza zamanı müşahidə olunan kondensasiya olunmuş xromosomları yaradır (Şəkil 8-35).



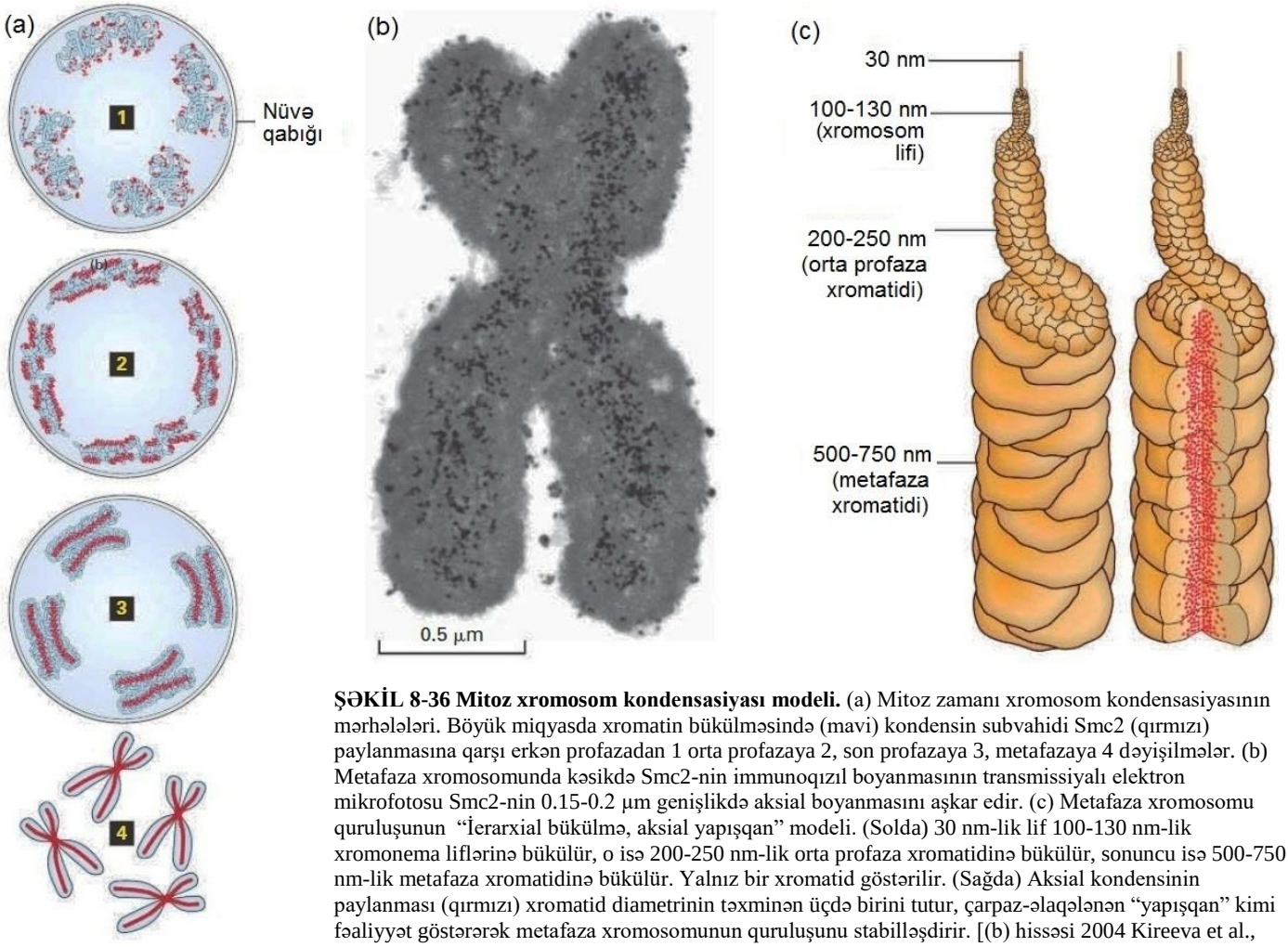
ŞƏKİL 8-35 Tipik metafaza xromosomu. Skanedici elektrom mikrofotosundan göründüyü kimi, xromosom replikasiya edir və hər biri iki identik DNT molekulundan birinə malik olan iki xromatiddən təşkil olunur. Konstruksiyada xromatidlərin birləşdiyi sentromer mitozun sonunda onların ayrılması üçün lazımdır. Uclarda xüsusi telomer ardıcıllıqlar xromosom qısalmasının qarşısının alınması funksiyasını yerinə yetirir. [Andrew Syred/Science Source.]

Metafaza xromosomlarında xromatinin geometriyası yaxşı anlaşılmamışdır. Qurbağanın yumurta ekstraktı ilə aparılan eksperimenlər göstərdi ki, SMC subvahidlərdən təşkil olunmuş *kondensin* adlanan zülal kompleksi (bax Şəkil 8-32 və Fəsil 19) ATP hidrolizindən alınan enerjidən istifadə edərək xromosom kondensasiyasına kömək edir. Məməlilərin xromosomlarının mikroskopik analizi göstərir ki, onlar profaza zamanı kondensasiya olunarkən, profazanın ilkin dövründəki 30 nm-lik xromatin liflər nüvə qabığı ilə assosasiyada olan 100-130 nm-lik *xromonema* liflərdə bükülürlər (Şəkil 8-36). Sonra xromonema lifləri diametri 200-250 nm olan, *orta profaza xromatidi* adlandırılan liflərdə bükülürlər (Şəkil 8-36a, 3), bunlar isə sonra bükülərək nüvə qabığı endoplazmatik şəbəkədən ayrılıb uzaqlaşarkən metafaza zamanı müşahidə olunan 500-750 nm diametrli xromatidləri yaradırlar (Şəkil 8-36a, 4, həmçinin bax Fəsil 19). Nəhayət sonda, hüceyrə tsiklinin öncəki S fazasında DNT replikasiyası zamanı yaranan, tam asossasiya olunmuş iki qız xromosomları (bax Şəkil 1-21), eukariotların çoxunda sentromer adlandırılan orta konstruksiya ilə bir-birinə bağlanan, tam uzunluqlu mil-şəkilli quruluşda (xromatiddə) kondensasiya olunurlar (bax Şəkil 8-35). Kiçik qızıl kürəciklərə bağlı olan anti-SMC anticismlə boyanmış metafaza xromosomundan keçən kəsiyin elektron mikrofotosu (Şəkil 8-36b) göstərir ki, böyük ehtimalla xromatin ilgəklərin əsasında duran kondensin (Şəkil 8-32c) xromatid diametrinin üçdə bir hissəsini tutur (Şəkil 8-36c, *sağda*), o burada hər bir xromatidin forma əmələ gətirməsinə kömək edir.

Əlavə Qeyri-Histon Zülallar Transkripsiyanı və Replikasiyanı Tənzimləyir

Artıq bizim gördüyümüz kimi, DNT ilə birləşmiş vəziyyətdə olan histonların ümumi kütləsi təxminən xromatiddə DNT-nin miqdarı ilə bərabərdir. İnterfaza xromatini və metafaza xromosomları az miqdarda başqa zülal dəstlərindən ibarət olan kompleksə də malikdir. Məsələn, minlərlə müxtəlif transkripsiya faktorları interfaza xromosomu ilə birləşmiş vəziyyətdə olurlar. Transkripsiyanı tənzimləyən belə kritik əhəmiyyətli qeyri-histon zülalların quruluşu və funksiyası Fəsil 9-da verilmişdir. Nisbətən az miqdarda yayılan, xromatinlə birləşmiş qeyri-histon zülallar eukariotik hüceyrələrin bölünməsi zamanı DNT-nin replikasiyasını tənzimləyir (Fəsil 19).

Bir neçə digər DNT-birləşdirən qeyri-histon zülallar transkripsiya və replikasiya faktorlarından daha çox miqdarda olurlar. Bunlardan bəziləri elektroforezlə ayrılma zamanı yüksək mobillik göstərdiklərinə görədə onlara *HMG zülallar* (*high-mobility group*) adı verilmişdir. Daha çox zəngin olan HMG zülallarını kodlaşdıran genlər maya hüceyrələrində silindikdə genlərin çoxunun normal transkripsiyasının pozulduğu müşahidə olunmuşdur. Aşkar olunmuşdur ki, bəzi HMG zülallar bəzi transkripsiya faktorlarının bir-birinə çox yaxın yerləşmiş spesifik DNT ardıcıllığına kooperativ birləşməsinə kömək edərək, Fəsil 9-da müzakirə olunduğu kimi, qonşu genlərin transkripsiyasını tənzimləyən çoxzülallı kompleksi stabilləşdirirlər.



ŞƏKİL 8-36 Mitoz xromosom kondensasiyası modeli. (a) Mitoz zamanı xromosom kondensasiyasının mərhələləri. Böyük miqyasda xromatin bükülməsində (mavi) kondensin subvahidi Smc2 (qırmızı) paylanmasına qarşı erkən profazadan 1 orta profazaya 2, son profazaya 3, metafazaya 4 dəyişilmələr. (b) Metafaza xromosomunda kəsikdə Smc2-nin immunoqızıl boyanmasının transmissiyalı elektron mikrofotosu Smc2-nin 0.15-0.2 µm genişlikdə aksial boyanmasını aşkar edir. (c) Metafaza xromosomu quruluşunun "İerarxial bükülmə, aksial yapışqan" modeli. (Solda) 30 nm-lik lif 100-130 nm-lik xromonema liflərinə bükülür, o isə 200-250 nm-lik orta profaza xromatidinə bükülür, sonuncu isə 500-750 nm-lik metafaza xromatidinə bükülür. Yalnız bir xromatid göstərilir. (Sağda) Aksial kondensinin paylanması (qırmızı) xromatid diametrinin təxminən üçdə birini tutur, çarpaz-əlaqələnən "yapışqan" kimi fəaliyyət göstərərək metafaza xromosomunun quruluşunu stabilləşdirir. [(b) hissəsi 2004 Kireeva et al., The Journal of Cell Biology. 166:775-785. doi: 10.1083/jcb.200406049-dən.]

8.5 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Eukariotik Xromosomların Quruluşunun Təşkili

- Eukariotik hüceyrələrdə DNT xromatin adlandırılan yüksək kondensasiya olunmuş nukleoprotein kompleks daxilində bərabər kütləyə malik olan histon zülallarla assosasiyada olur. Xromatinin qurulduğu bloklar histon oktamerlərdən təşkil olunmuş və ətrafında 147 əc uzunluqda DNT-nin sarındığı nukleosomlardır (bax şəkil 8-24).
- Xromatin hüceyrə daxilində, DNT-nin transkripsiyaya görə qeyri-fəal rayonlarında 30 nm lif formasında və yüksək səviyyəli quruluşda olan kondensasiya olunmuş vəziyyətdə olur (bax Şəkil 8-25 və 8-36).
- Belə hesab olunur ki, xromatin hüceyrə daxilində DNT-nin transkripsiyaya görə fəal rayonlarında, açıq genişlənmiş formada olur.
- Histonların dəyişkən, daxilən nizamsız N-sonluqlu quyruğu, xüsusilə də H4 lizin 16 sapa-düzülmüş-muncuq xromatinin (10 nm xromatin lifi) 30 nm-lik liflərə bükülməsindən ötrü tələb olunur.
- Histon quyruqlar asetilləşmə, metilləşmə, fosforlaşma və ubikvitinləşmə ilə modifikasiya oluna bilirlər (bax Şəkil 8-26). Bu modifikasiyalar histon quyruqlarının digər, nisbətən az olan xromatin-assosasiyalı zülallara birləşməsini tənzimləməklə xromatinin quruluşuna təsir edirlər.
- Özək histonlatrın N-sonluğunda lizin qalıqlarının geriyə dönə bilən asetilləşməsi və deasetilləşməsi xromatin kondensasiyasını tənzimləyir. Transkripsiya, replikasiya və reparasiya proseslərinə daxil olan zülallar və DN-aza I kimi fermentlər xromatinin hiperasetilləşmiş histon quyruqlarını (euxromatini) hipoasetilləşmiş histon quyruqlarına (heteroxromatin) nisbətən daha asanlıqla əldə edirlər.
- İnterfaza zamanı metafaza xromosomları dekondensasiya edərkən heteroxromatin sahələri euxromatin sahələrəinə nisbətən daha çox kondensasiya olunmuş vəziyyətdə qalırlar.
- Heteroxromatin zülal 1 (HP1) xromodomendən istifadə edərək lizin 9-da tri-metilləşmiş histon H3 ilə birləşir. HP1-in xromokölgə domeni öz-özü ilə və H3 lizin 9-u metilləşdirən histon metil transferaza ilə assosasiyada olur. Bu qarşılıqlı əlaqələr 30 nm xromatin liflərinin kondensasiyasına və heteroxromatik quruluşun xromosom

boyu hüdüd elementlərinə rast gələnə qədər paylanmasına səbəb olur (bax Şəkil 8-29).

- Məməlilərin dişi fərdlərinin demək olar ki, hər bir hüceyrəsində X xromosom yüksək kondensasiya olunmuş bir heteroxromatindən ibarətdir, bu da qeyri-fəal xromosomda demək olar ki, bütün genlərin ekspressiyasının repressiyası ilə nəticələnir. Bu fəalsızlaşma doza kompensasiyasının yaranmasına səbəb olur, beləliklə, X xromosom üzərində olan genlər həm erkək həm də dişi fərdlərdə eyni səviyyədə ekspressiya olunurlar.
- Hər bir eukariotik xromosom tək nukleosomlarda yığılmış və onu fluoressent nişanlanmış DNT problarla hibridləşmə yolu ilə müşahidə olunan meqaəsaslı ilgəklərdə və oositlərdə müşahidə olunan fırça xromosomlar daxilində təşkil etdiyi ehtimal olunan (bax Şəkillər 8-30, 8-31, və 8-32c) **x**romosom **q**uruluşunun **s**axlanılması (**SMC** – structural maintenance of chromosome) zülalları ilə assosasiyada olan 30 nm-lik xromatin liflərdə bükülmüş bir DNT molekuluna malikdir. Xromosomların əlavə bükülmələri daha sonra metafaza xromosomnlarına yüksək dərəcədə kondensasiya olunmuş kompakt quruluşu verir (bax Şəkil 8-36).
- İnterfaza hüceyrələrində xromosomlar nüvədə bir-birini örtməyən "ərazilərdə" lokalizasiya olunurlar (bax Şəkil 8-33).
- Xromosom konformasiya tutulması metodları göstərir ki, xromatin hüdud elementləri ilə ayrılan topoloji domenlərdə qurulmuşdur (bax Şəkil 8-34c). Bu topoloji domenlər oositlərin nəhəng nüvəsində müşahidə olunan (bax Şəkil 8-31) və interfaza nüvələrinə hibridləşdirilmiş fluoressent nişanlanmış DNT problarının tədqiqatları ilə nəticələnən fırça xromosomlarındakı ilgəklərə uyğun gəlir (bax Şəkil 8-30).
- Mitoz zamanı xromosomlar güclü şəkildə kondensasiya olunur, onların uzunluğu bir neçə dəfə qısalır, diametrləri isə artaraq işıq mikroskou ilə görünən metafaza xromosomunu yaradır. 30 nm-lik xromatin lifinin geometriyası tam başa düşülmür, amma diametrin artmasının və uzunluğun azalmasının intermediatları profaza zamanı müşahidə olunmuşdur.

8.6 Eukariotik Xromosomların Morfologiyası və Funksional Elementləri

Əvvəlki bölmədə xromosomların quruluş təşkilinin dəqiqliyini öyrəndikdən sonra biz indi ona daha qlobal perspektivdən baxaq. Xromosomların sayı və ölçüsü, həmçinin onların rənglənmə profili üzrə ilkin mikroskopik müşahidələr xromosom quruluşunun çoxsaylı əhəmiyyətli xüsusiyyətlərinin aşkar olunmasına səbəb oldu. Nəticədə, tədqiqatçılar hüceyrə bölünməsi zamanı xromosomların replikasiyası və qız hüceyrələrə seqreqasiyası üçün kritik əhəmiyyətə malik olan xüsusi xromosom rayonlarını identifikasiya etdilər. Bu bölmədə biz xromosomların belə funksional elementlərini müzakirə edəcəyik və xromosomların təkamüldə əcdad xromosomların nadir yenidən qurulma yolu ilə necə inkişaf etdiyini müzakirə edəcəyik.

Metafazada Xromosomların Sayı, Ölçüsü və Forması Növ-Spesifikdir

Əvəllər qeyd olunduğu kimi, interfaza hüceyrələrində xromosom əraziləri xromosom-spesifik fluoressent nişanlanmış hibridləşmə probları ilə vizuallaşdırıla bilir (bax Şəkil 8-33), lakin fərdi xromosomların dəqiq quruluşu hətta elektron mikroskopunun köməyi ilə də müşahidə edilə bilmir. Amma mitoz və meyoz zamanı xromosomlar kondensasiya olunur və işıq mikroskopunda da görünür. Ona görə də demək olar ki, bütün sitogenetik işlər (məsələn, xromosomların morfologiyasının öyrənilməsi) ya somatik hüceyrələrdə mitoz zamanı, ya da qamet hüceyrələrinin meyoz bölünməsi zamanı bölünməkdə olan hüceyrələrdən alınan kondensasiya olunmuş metafaza xromosomları üzərində aparılır.

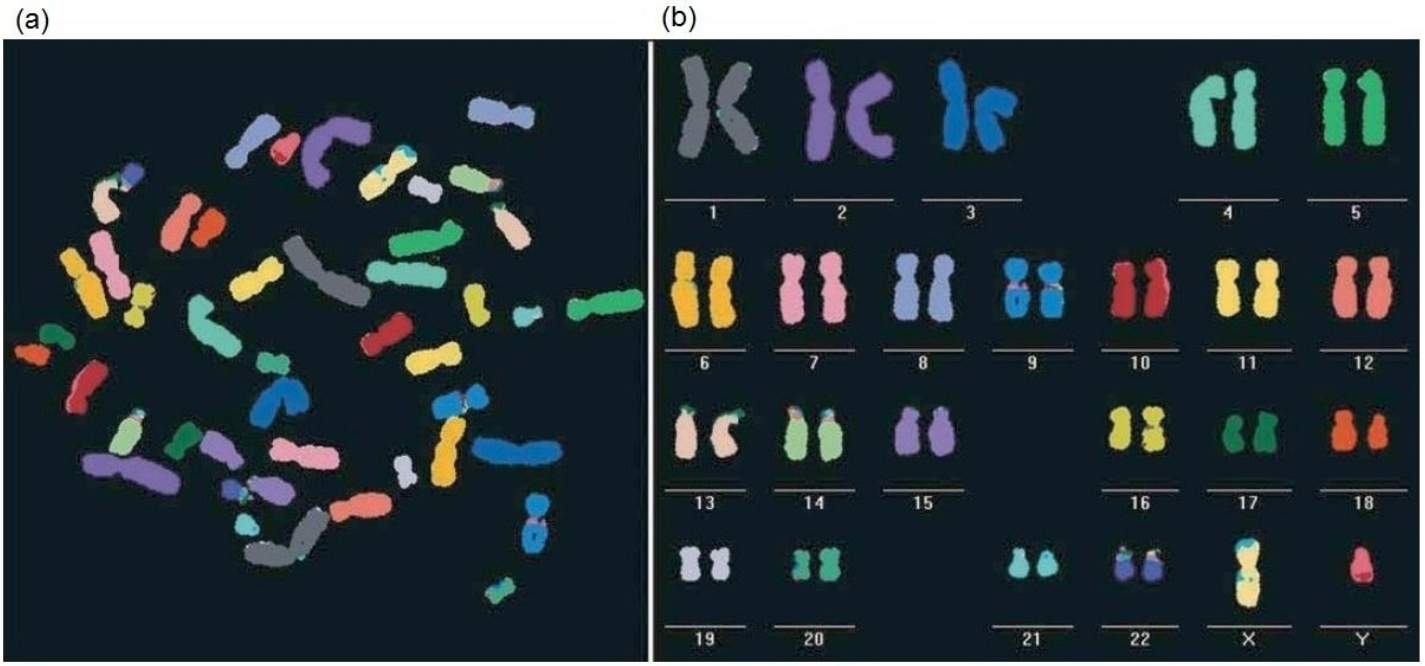
Metafaza xromosomlarının kondensasiyası yəqin ki, 30 nm-lik xromatin liflərin bir sıra ardıcıl bükülmələri nəticəsində yaranır (bax Şəkil 8-36). Mitoz zamanı hüceyrələr hüceyrə tsiklinin S fazasından keçərək inkişaf etmiş və öz DNT-lərini replikasiya etmişlər. Bu səbəbdən də metafaza zamanı görünə bilən xromosomlar *duplikasiya olunmuş* quruluşda olurlar. Hər bir metafaza xromosomu sentromer adlandırılan sıxılmış rayonunda bir-birilə əlaqədə olan iki qız **xromatiddən** təşkil olunmuşdur (Şəkil 8-35).

Metafaza xromosomlarının sayı, ölçüsü və forması hər bir növ üçün fərqli olan **karyotipləri** yaradır. Orqanizmlərin əksəriyyətində bütün somatik hüceyrələr eyni kariotipə malikdirlər. Amma bir-birinə kifayət qədər oxşar olan növlər çox fərqli kariotipə malik ola bilərlər, bu göstərir ki, oxşar genetik potensial xromosomlarda çox fərqli yollarla formalaşa bilər. Məsələn, kiçik maralların iki müxtəlif növü – Hindistan muntajı, Reeve muntajı təxminən eyni miqdarda ümumi genom DNT-yə malikdirlər. Bu növlərin birində DNT 22 cüt homoloji **autosomlarda** və fiziki ayrılmış iki cinsiyyət xromosomlarında təşkil olunmuşdur. Digər növ isə əksinə, məməlilər arasında ən az sayda xromosomlara malikdir, yalnız üç cüt autosomları, bir cinsiyyət xromosomu fiziki olaraq ayrılmışdır, digəri isə autosomlardan birinin sonluğuna birləşmişdir.

Metafaza Zamanı Xromosomlar Bəndvermə Profilinə və Xromosom Rəngləməsinə Görə Fərqlənə Bilərlər

Bəzi boyalar selektiv şəkildə metafaza xromosomlarının bəzi rayonlarını digərlərinə nisbətən daha intensiv rəngləyirlər və hər bir fərdi xromosom üçün spesifik olan xarakterik bənd əmələ gətirmə profili yaradırlar. Xromosom bəndlərinin mütəmadiliyi (ardıcıllığı) hər bir xromosomun uzunluğu boyu görünə bilən, onun əhəmiyyətli fərqləndirici nişanı kimi xidmət edir və bizim bu bölmədə sonra görəcəyimiz kimi, oxşar ölçüdə və formada olan xromosomları fərqləndirməyə imkan verir.

Bu gün *xromosom rəngləmə* metodu eyni ölçüdə və formada olan fərdi xromosomları kariotip daxilində fərqləndirməyi çox sadələşdirir. Bu metodun variasiyası kimi istifadə olunan f**luoressent in situ hibridləşmə** (**FİSH**) hər bir xromosomun uzunluğu boyu səpilmiş saytlara spesifik olan nişanlanmış problardan istifadə edir. Bu problar fərqli həyacanlanma və emissiya dalğa uzunluqlarına malik olan bir sıra müxtəlif fluoressent boyalarla nişanlanır. Hər bir xromosom üçün spesifik olan prob hər bir boyanın əvvəlcədən təyin olun-



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 8-37 İnsan xromosomları xromosom rəngləmələri ilə asanlıqla identifikasiya olunur. (a) İnsanın erkək fərdinin hüceyrələrində mitoz zamanı xromosom rəngləyən problardan istifadə etməklə xromosomların fluoressent in situ hibridləşməsi (FISH). (b) İnsanın normal erkək kariotipinin aşkar olunması üçün rənglənmiş bu xromosomların kompüter qrafik proqramları ilə düzləndirilməsi [Nəzakətlə Dr. Michael R.Speicher-dən.]

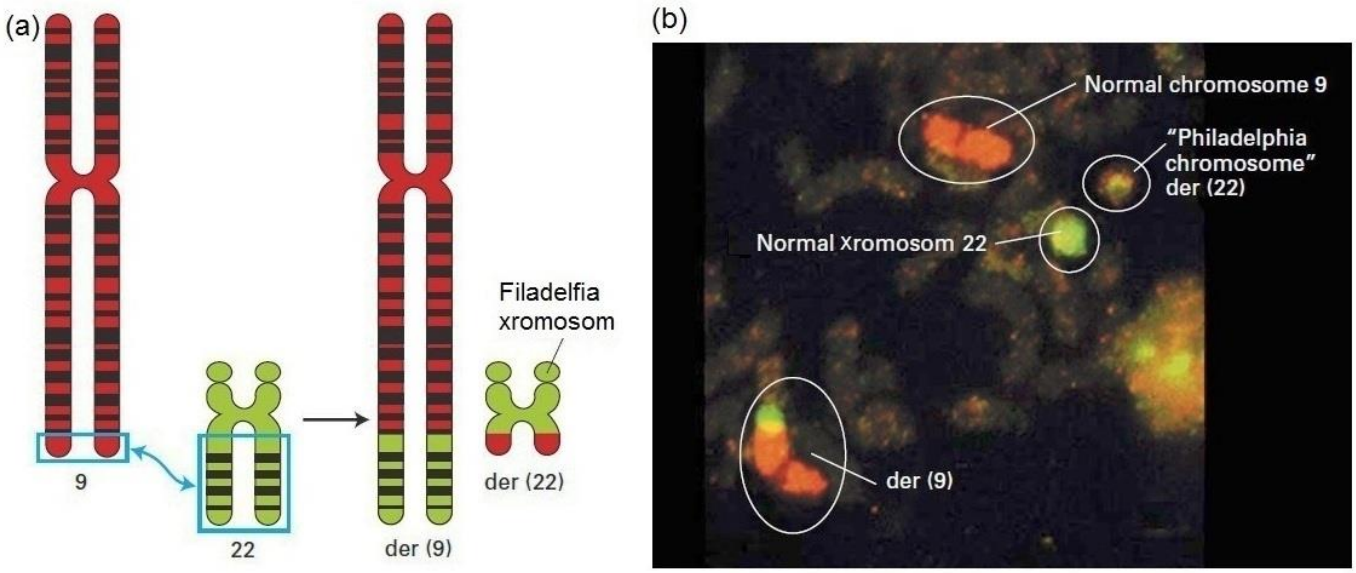
muş fraksiyaları ilə nişanlanır. Problar xromosomlara hibridləşdikdən sonra və probların artığı uzaqlaşdırıldıqdan sonra nümunə fluoressent mikroskopunda müşahidə olunur, mikroskopun detektoru mikroskopik sahədə hər bir fluoressensiya olunan mövqedə hər bir boyanın fraksiyasını təyin edir. Bu informasiyalar kompüterə göndərilir və xüsusi proqram hər bir xromosom tipi üçün saxta rəngdə təsviri təyin edir (Şəkil 8-37a). Kompüter qrafiki imkan verir ki, hər bir xromosomun iki homoloqu bir-birinin yanında düzülsün və onlar ölçülərinin azalması istiqamətinə uyğun olaraq nömrələnsin. Bu cür təsviretmə hüceyrənin kariotipini aydın şəkildə göstərir (Şıkil 8-37b).

Xromosom rənglənməsi qeyri-normal sayda olan xromosom miqdarını, məsələn, Daun sindrom xəstələrində xromosom 21 trisomu təyin etmək üçün və ya çox nadir fərdlərdə və ya xərçəng hüceyrələrində əmələ gələn xromosom translokasiyalarını təyin etmək üçün çox güclü metoddur (Şəkil 8-38). Normal insanın hər bir xromosomu boyunca fərqli mövqelərdə hibridləşən fluoressent boyaların müxtəlif nisbətlərdə istifadə olunması xromosomların daha incə quruluş analizlərini aparmağa imkan verir, bu da xromosom rayonlarındakı silinmələri (delesiyalar) və ya duplikasiyaları asanlıqla aşkar etməyə imkan yaradır. Fəslin açılış şəkili insanın normal dişi fərdində kariotiplərin analizlərində belə *çoxrəngli FİSH*-in istifadəsini göstərir.

Xromosom Rənglənməsi və DNT Ardıcıllığının Oxunması Xromosomların Təkamülünü Aşkar Edir

Müxtəlif növlərdən olan xromosomların analizi xromosomların təkamülü və inkişafı barədə əhəmiyyətli dərəcədə bilikləri təmin etdi. Məsələn, ağac siçanının (*Tupaia belangery*) 16-cı xromosomunun rənglənmiş xromosom problarının ağac siçanının metafaza xromosomu ilə hibridləşməsi, gözlənildiyi kimi, xromosom 16-nın iki nüsxəsini aşkar etdi (Şəkil 8-39a). Amma rənglənmiş eyni xromosom problarla insanın metafaza xromosomları arasında hibridləşdirilmə aparıldıqda probların əksəriyyəti xromosom 10-un uzun çiyninə hibridləşdi (Şəkil 8-39b). Sonra insanın 10-cu xromosomunun uzun çiyninin müxtəlif fluoressent boya ilə nişanlanmış çoxsaylı probları insanın 10-cu xromosomu ilə və ağac siçanının metafaza xromosomları ilə hibridləşdirildi, bu problar ağac siçanının 16-cı xromosom ardıcıllıqlarına onların insanın 10-cu xromosomunda aşkar edilmiş eyni düzülüş ardıcıllığında birləşdilər.

Bu nəticələr göstərir ki, təkamül prosesində insan və ağac siçanı öz mənşəyini təxminən 85 million il öncə yaşamış ümumi əcdaddan almışlar, uzun əcdad xromosomlardan birinin uzun davam edən DNT ardıcıllığı ağac siçanında 16-cı xromosoma çevrilmiş, insanda isə inkişaf edib 10-cu xromosomun böyük çiyninin yaratmışdır. Hər iki növün xromosomlarında genlərin ardıcıllığındakı bu cür oxşarlığın meydana çıxması **sinteni** (**synteny**) adlanır (Latın dilindən götürülüb mənası "eyni lent üzərində" deməkdir). İki və daha artıq genlərin iki və daha artıq növlərdə ümumi xromosom rayonunda təmsil olunması konservativ sintenik seqmentləri göstərir.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 8-38 Xromosomal translokasiyalar xromosom rənglənənməsi ilə analiz oluna bilər. Xatrakterik xromosomal translokasiyalar müəyyən genetik pozuntularla və xərçəngin xüsusi tipləri ilə bağlıdır. Məsələn, xromiki myelogen leykomiya xəstələrinin demək olar ki, hamısında leyekemik hüceyrələr Filadelfia xromosomuna – qısalmış 22-ci xromosoma [der (22)] və anormal uzun xromosom 9-a [der (9)] malikdirlər (burada "der" derivative - törəmə bildirir). Bu nəticələr normal xromosom 22 və 9 arasında baş verən translokasiyanın nəticəsidir. Bu translokasiya diaqram (a)-da verilmiş klassik bəndləmə analizləri ilə və xromosom rənglənmə yolu ilə (b) ilə aşkar oluna bilər. [(b) hissəsi hörmətlə J. Rowley and R. Spinosa-dan.]

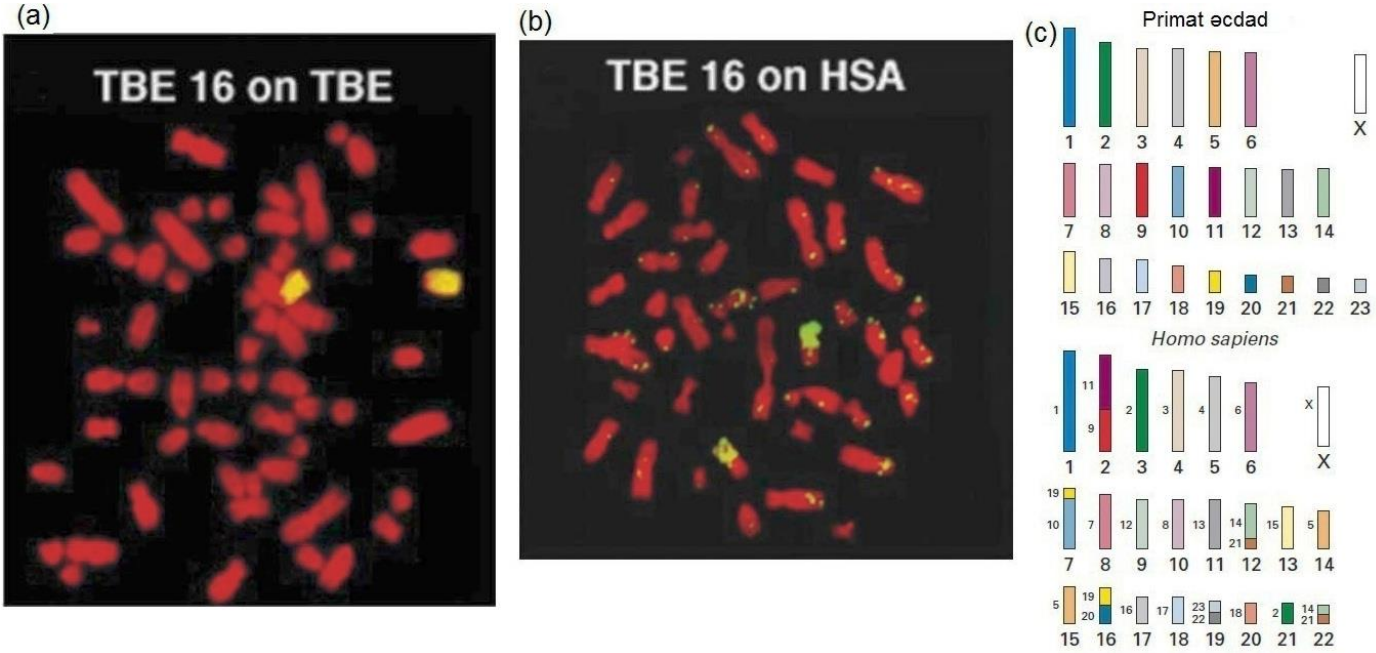
Çoxsaylı müxtəlif primatların xromosomları arasında qarşılıqlı əlaqələr, insan və ağac siçanı üçün Şəkil 8-39a, b-də göstərildiyi kimi, rənglənmiş xromosom problarının hibridləşməsi yolu ilə aşkar edilmişdir. Bu qarşılıqlı əlaqələrin istifadəsi və DNT ardıcıllığının oxunması yolu ilə və başqa yollarla sinteni rayonların yüksək dərəcədə analizindən, bütün primatların ümumi əcdadının müasir pirimatların xromosomlarında sinteni rayonlarını yaratmaq üçün lazım olan xromosom yenidən quruplaşmasının minimum sayına əsaslanan ümumi əcdad kariotipinin olmasını güman etmək mümkün oldu.

Güman olunur ki, insan xromosomları bir sıra müxtəlif mexanizmlərlə 23 autosom və üstəgəl X və Y cinsiyyət xromosomlarına malik olan ümumi əcdaddan törəmişdir (Şəkil 8-39c). Bəzi insan xromosomları xromosom quruluşunda geniş miqyaslı yenidən qruplaşmalar olmadan ayrılmışdır. Güman olunur ki, başqaları əcdad xromosomların qırılıb iki xromosoma ayrılması hesabına və ya əksinə iki əcdad xromosomun qovuşması hesabına yaranıb inkişaf etmişdir. Hələ də başqa insan xromosomları güman olunur ki, fərqli xromosomların çiyinlərinin hissələrinin mübadiləsi (dəyişməsi) hesabına yaranmışdır, bu da iki müxtəlif əcdad xromosomun daxil olduğu resiprokal translokasiya yolu ilə baş verir. Çoxsaylı müxtəlif məməlilərin xromosomları arasında sinteny rayonların analizi göstərir ki, kəsilmə, birləşmə, translokasiyalar kimi xromosom yenidəndüzülmələri çox seyrək hallarda məməlilərin təkamülündə rast gəlinir, təxminən hər beş million ildə bir dəfə. Bu cür xromosom yenidəndüzülmələr meydana gələndə, onlar çox güman ki, yaranıb ayrıldıqları növlərlə cütləşə bilməyən yeni növün təkamülünə kömək etdilər.

Primatlar xətti üçün təxmin edilənlərə bənzər, xromosomal yenidəndüzülmələr başqa qrup qohum orqanizmlər üçün, o cümlədən onurğasızlar, bitkilər və göbələklərin qohum xətləri üçün də məlum olmuşdur. Təkamül əlaqələrinin proqnozları arasında çox gözəl razılaşma (uyğunluq) oxşar anatomik quruluşa malik olan (oxşar bədən quruluşuna malik olan məməlilər arasında və həşəratlar arasında, oxşar bitkilər arasında və sair) orqanizmlərin xromosomlarının sintenik rayonlarının analizinə əsaslanır və qazıntı qeydlərinə və homoloji genlər üçün DNT ardıcıllığının divergensiya ölçüsünə əsaslanan təkamül əlaqələri müasir orqanizmlərin müxtəlifliyinin yaranması prosesində takamülün qanunauyğunluğuna çox güclü arqumentdir.

İnterfaza Politon Xromosomlar DNT Amplifikasiyası Yolu İlə Yaranır

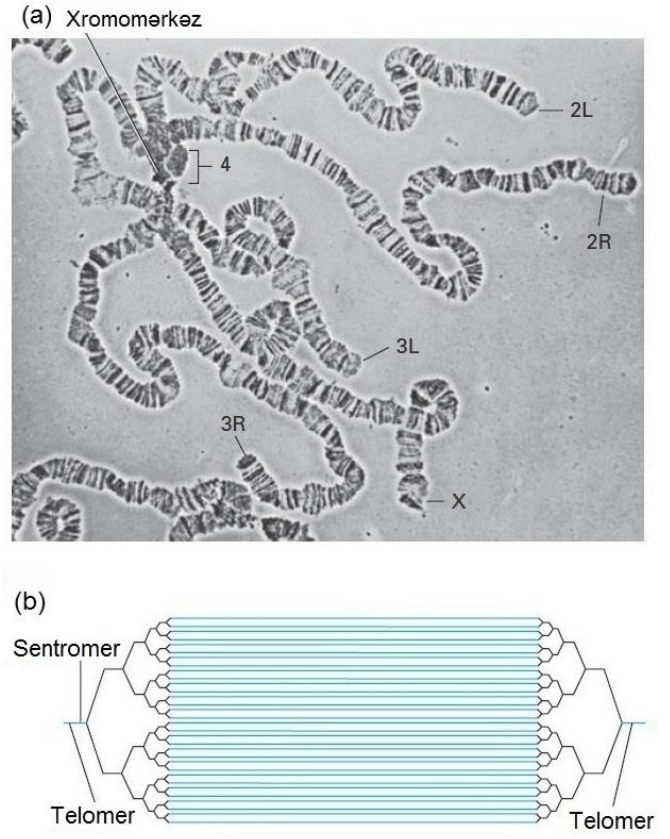
Drosophila növlərinin və başqa ikiqanadlı həşaratların süfrəsinin tüpürcək vəziləri hətta işıq mikroskopu altında görünə bilən çox böyük intefaza xromosomlarına malik olurlar. **Politon xromosomlar** fiksasiya olunduqda və DNT-ni rəngləyən boya ilə rəngləndikdə böyük miqdarda özünü bərpa edən, yaxşı ayrılmış, standartlaşdırılmış nömrələrlə müəyyən olunmuş bəndlərlə xarakterizə olunur (Şəkil 8-40a). Daha tünd rənglənmiş bəndlər xromatinin daha çox kondensasiya olunmuş rayonlarını göstərir, zəif rənglənmiş bəndlər və bəndlər arası rayonlar az kondensasiya olunmuş xromatin hissələrini göstərir.



ŞƏKİL 8-39 Primatların xromosomlarının təkamülü. (a) Ağac siçanının (*T. Belangeri,* insanların uzaq qohumu) 16-cı xromosomu üçün xromosom rənglənmiş problar ağac siçanının metafaza xromosomlarına (*qırmızı*) hibridləşdirildi (*sarı*). (b) Eyni ağac siçanının 16-cı xromosomunun rənglənmiş probları insanın metafaza xromosomları ilə hibridləşdirildi. (c) İnsan xromosomlarının bütün primatların ümumi əcdadı olan (*yuxarıda*) əcdad xromosomlardan güman olunan təkamülü (*aşağıda*). Güman olunan ümumi əcdad xromosomlar onların ölçülərinə uyğun olaraq nömrələnmişdir, hər bir xromosom fərqli rənglə təmsil olunmuşdur. İnsan xromosomları da onlarım ölçülərinə uyğun olaraq nömrələnmişdir, rəngləri onların törəndikləri primatların güman olunan əcdad xromosomlarınınkı ilə eyniləşdirilşmişdir. İnsan xromosomunun rənglənmiş rayonundan sol tərəfdəki nömrələr həmin rayonun törəndiyi əcdad xromosomun nömrələrini göstərir. İnsan xromosomları primatların ümumi əcdadlarının güman olunan xromosomlarından əhəmiyyətli dərəcədə dəyişiklik baş vermədən (məsələn, insanın 1-ci xromosomu), qovuşmaqla (məsələn, insanın 2-ci xromosomu 9-cu və 11-ci əcdad xromosomların qovuşması), qırılmalarla (məsələn, insanın 14-cü və 15-ci xromosomları 5-ci əcdad xromosomun qırılması ilə yaranmışdır) və ya xromosom translokasiyaları (məsələn, 14-cü və 21-ci əcdad xromosomlar arasında resiprokal translokasiya insanın 12 və 22-ci xromosomlarını yaratmışdır) yolu ilə törəmişdir.[(a) və (b) hissələr Springer razılığı ilə Muller,S., et al., "Defining the ancestral karyotype of all primates by multidirectional chromosome painting between tree shrews, lemurs and humans," *Chromosoma,*1999, **108**(6):393-400-dan yenidən çap olunur; razılıq Copyright ClearanceCenter vasitəsilə alınmışdır. (c)hissəsi verilənlər L. Froenicke, 2005, *Cytogenet. Genome Res.* **108**:122-dən.]

Baxmayaraq ki, politon xromosomlarda bəndlərin formalaşmasına nəzarət edən molekulyar mexanizm hələ tam aydın deyil, amma *Drosophila* süfrələrinin tüpürcək vəzlərinin xromosomlarında görünən yüksək dərəcədə özünü yarada bilən bənd əmələgətirmə profili bu növlərdə xromosomların uzunluğu boyunca xüsusi DNT ardıcıllıqlarının yerinin təyin edilməsində çox güclü bir metoddur. Politen xromosomlarda xromosom translokasiyaları və yerdəyişmələri (inversion) asanlıqla aşkar edilə bilir və interfaza politon xromosomlarında spesifik xromosom zülallarının yerini onlara qarşı xüsusi anticismlərdən istifadə etməklə immunorəngləmə metodu ilə asanlıqla aşkar etmək olur (bax Şəkil 9-15). Həşaratların politen xromosomları bütün təbiətdə dekondensasiya olunmuş interfaza xromosomları üzərində bu cürə immunolokalizasiya tədqiqatlarının mümkün olduğu tək eksperimental sistemlərdən birini təqdim edir.

DNT-nin ümumiləşdirilimiş amplifikasiyası *Drosophila* süfrələrinin tüpürcək vəzlərində politen xromosomların tapılmasına səbəb olmuşdur. *Politenizasiya* adlandırılan bu proses o vaxt baş verir ki, DNT molekulu telomerlər və sentromer istisna olmaqla qalan bütün sahələrində təkrar-təkrar replikasiya olunur, amma qız xromosomlar ayrılmırlar. Nəticədə, özünün çoxsaylı nüsxələrindən təşkil olunmuş çox böyümüş xromosom 1024 nüsxədə *Drosophila melanıgaster* süfrələrinin tüpürcək vəzlərində bu cür on replikasiya nəticəsində yaranır (Şəkil 8-40b). Yəqin ki, süfrələrin iri (massiv) vəz hüceyrələrində zülal sintezi üçün kifayət qədər mRNT-ni təmin etmək üçün xromosomal DNT-nin amplifikasiyası genlərin nüsxələrinin sayını güclü sürətdə artırır. *Drosophila* politen xromosomlarda bəndlər təxminən 50000-100000 qədər əsas cütünü təmsil edir və bəndəmələgəlmə pofili aşkar edir ki, DNT-nin kondensasiyası interfaza xromosomunun nisbətən qısa olan bu rayonlarında çox dəyişir.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 8-40 ***Drosophila*** **tüpürcək vəzilərinin politon xromosomlarında bənd əmələgəlmə**. (a) *Drosophila melanogaster* süfrələrinin tüpürcək vəzilərinin xromosomlarının işıq mikroskopu altında çəkilmiş bu şəkilində dörd xromosomun (X, 2, 3 və 4) ümumilikdə təxminən 5000 fərqlənə bilən bəndləri müşahidə olunur. Bənd əmələgəlmə profili, DNT-nin və zülalların xromosom boyu hər bir amplifikasiya olunmuş saytlar daxilində təkrar yarana bilən (reproducible) bükülməsi nəticəsində baş verir. Tünd bəndlər daha çox sıxılmış kompakt xromatin rayonlarıdır. Bütün dörd xromosomun sentromerləri tez-tez hallarda xromomərkəzdə qovuşmuş vəziyyətdə görünürlər. Xromosom 2 və 3-ün ucları X xromosomun uclarında olduğu kimi nişanlanmışdır (L= sol çiyin; R=sağ çiyin). (b) Beş replikasiya müddətində xromosom 4-ün amplifikasiya profili. İkizəncirli DNT bir xətlə təmsil olunmuşdur. Telomer və sentromer DNT amplifikasiya olunmamışdır. Tüpürcək vəzilərin politon xromosomlarında hər bir valideyin xromosom təxminən 10 replikasiyaya uğrayır (2^{10}=1024 xətlər). Bax (b) C.D. Laird et al., 1973, *Cold Spring Habor Symp. Quant.Biol*. **38**:311. [(a) hissəsi hörmətlə Carnegie İnstitution for Science, J.Gall tərəfindən verilmişdir;]

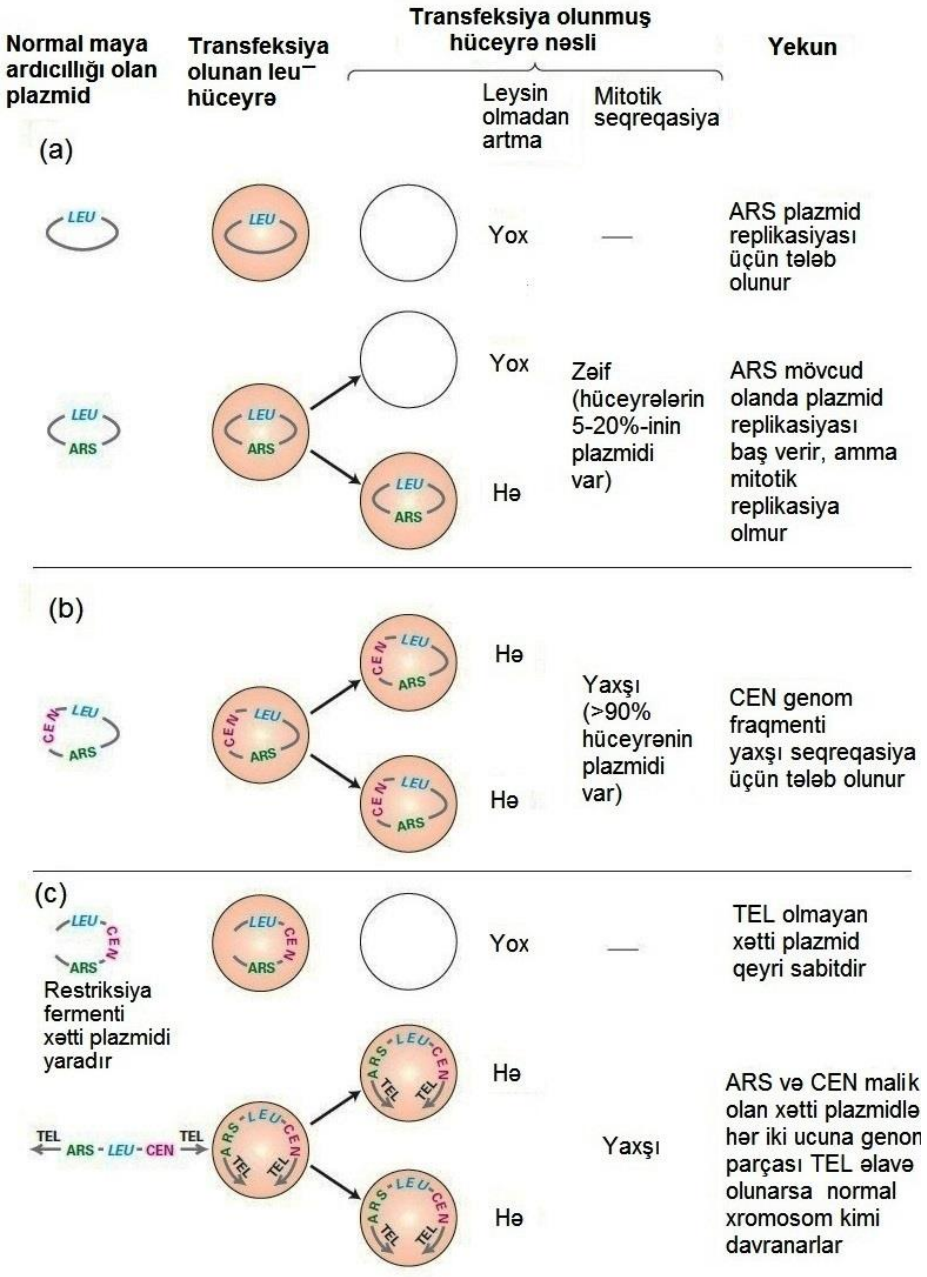
Xromosomların Replikasiyası və Stabil İrsiyyəti üçün Üç Funksional Element Tələb Olunur

Baxmayaraq ki, eukariotik xromosomlar növlər arasında uzunluğuna və sayına görə fərqlənirlər, sitogenetik tədqiqatlar göstərmişdilər ki, onların hamısı hüceyrə bölünməsi zamanı özlərini eyni cür aparırlar. Bundan əlavə, istənilən eukariotik xromosom düzgün replikasiya və seqreqasiya etmək üçün üç funksional elementə malik olmalıdır: (1) DNT polimerazanın və başqa zülalların DNT-sinin sintezini inisiasiya etməsi üçün **replikasiya mənşələri** (**origin**s) olmalı (bax Şəkil 5-31 və 5-33); (2) **sentromer** – qız xromosomların düzgün seqreqasiya etməsi üçün tələb olunan formalaşmış xromosom rayonu və (3) iki uclardakı **telomerlər**. Şəkil 8-41-də təsvir edilmiş maya transformasiya tədqiqatları bu üç xromosom elementlərinin funksiyasını və onların xromosomun funksiyasında təyin edilmiş əhəmiyyətini göstərir.

Fəsil 5-də müzakirə olunduğu kimi DNT-nin replikasiyası eukariotik xromosom boyu səpilmiş saytlardan başlanır. Maya xromososomu *avtonom replikasiya edən ardıcıllıqlar* (*autonomously replicating sequences* - ARS) adlanan, təxminən 100 əc ölçüdə olan çoxsaylı ardıcıllıqlara malikdir. ARS-ın dairəvi plazmidə daxil edilməsi ilə mayada plazmidə replikasiya etməyə imkan verilməsi üzrə aparılan tədqiqatlar ilk dəfə eukariotik DNT-də replikasiya məşəi (origin) ardıcıllığının funksional identifikasiyası olmuşdur (bax Şəkil 8-41a).

Baxmayaraq ki, ARS-a malik olan plazmidlər maya hüceyrələrində replikasiya edirlər, amma plazmidlərin düzgün mitoz seqreqasiyası olmadığından yeni nəsil hüceyrələrin yalnız 5-20 faizi plazmidə malik olur. Amma maya xromosomlarının **sentromerlərindən alınmış CEN** ardıcıllığa malik olan plazmidlər mitoz zamanı bərabər və ya ona çox yaxın dərəcədə həm ana həm də qız hüceyrələrə seqreqasiya edirlər (bax Şəkil 8-41b).

Əgər ARS və CEN ardıcıllıqlarına malik olan dairəvi plazmidlər restriksiya fermenti ilə kəsilərsə, alınmış xətti plazmidlər onların hər iki sonluğuna xüsusi telomer (TEL) ardıcıllıqlar liqasiya olunmayınca onlar maya hüceyrələrinə transformasiya olunmayacaq və LEU^+ koloniyalarını yaratmayacaqlar (bax Şəkil 8-41c). Maya hüceyrələrinə xətti plazmidlərin transfeksiyasının daxil olduğu ilk uğurlu eksperimentlər kirpikli protozoan *Tetrahymen*a-da xətti molekul kimi replikasiya olunması məlum olan DNT molekulunun sonluqlarını istifadə etməklə alınmışdır. *Tetrahimena*-nın həyat tsiklinin müəyyən hissəsində nüvə DNT-sinin çox nüsxəsi qısa hissələrdə təkrar-təkrar çıxarılaraq *makronüvəni* (*macronucleus*) yaradır. Təkrarlanan bu fraqmentlərdən biri ribosomal DNT-nin dimeri kimi identifikasiya olunmuşdur və onun ucları $(G_4T_2)_n$ təkrarlanan ardıcıllıqlara malik olmuşdur. Bu təkrarlanan TEL ardıcıllığın bir bölməsi tərkibində ARS və CEN olan mayanın xətti plazmidinin sonluqlarına liqasiya olunduqda xətti plazmidin normal replikasiyası və seqreqasiyası baş vermişdir. Telomerlərin belə ilk klonlaşdırılması və xarakterizasiyası 2009-cu ildə Tibb və Fiziologiya üzrə Nobel Mükafatına layiq görülmüşdür.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 8-41 Maya transformasiya eksperimentləri xromosomun normal replikasiyası və seqreqasiyası üçün lazım olan funksional xromosom elementlərini identifikasiya etmək üçün istifadə edilir. Bu təcrübələrdə normal maya göbələyi hüceyrələrində LEU geninə malik olan plazmidlər konstruksiya olundu və transfeksiya yolu ilə *leu*⁻ hüceyrələrinə keçirildi. Əgər plazmid *leu*⁻ hüceyrələrində saxlanılırsa onlar plazmiddəki *LEU* geni ilə *LEU*⁺ hüceyrələrinə transformasiya olunacaq və leysin olmayan mühitdə koloniyalar yarada biləcək. (a) Plazmidin *avtonom replikasiyaya* imkan yaradan *ardıcıllığı* (ARS) onların *LEU* geninə malik olan plazmid vektora daxil edilməsinə görə identifikasiya olundu, çünki onların klonlaşdırılmış *LEU* olan plazmidə keçirilməsi yüksək dərəcədə *LEU*⁺-ya transformasiya olunmasına səbəb oldu. Amma hətta ARS ilə olan plazmidlər mitoz zamanı zəif seqreqasiya nümayiş etdirir və ona görə də bütün qız hüceyrələrdə görünmürlər. (b) Maya genom DNT-sinin təsadüfi qırılmış hissələri ARS və *LEU*-ya malik olan plazmidə keçirilərkən, bəzi transfeksiya olunmuş hüceyrələr böyük koloniyalar əmələ gətirirlər, bu da göstərir ki, onların plazmidləri arasında mitoz seqreqasiyanın yüksək səviyyəsi qız hüceyrələrin davam edən şəkildə artmasına (çoxalmasına) imkan yaradır. Bu böyük koloniyalarda plazmidlərdən bərpa olunmuş DNT maya sentromerlərin (CEN) ardıcıllıqlarına malik olur. (c) *leu*⁻ maya hüceyrələri, *LEU*, ARS və CEN-ə malik olan xətti şəkilə keçirilmiş plazmidlə transfeksiya olunanda koloniyalar bitmir. Xətti DNT-nin uclarına Telomer (TEL) ardıcıllıqların əlavə olunması replikasiya qabiliyyətinə malik olan yeni xromosom kimi xəttiləşmiş plazmidi yaradır, bu da daha çox mitoz və meyoz zamanındakı normal xromosoma bənzəyir. Bax A.W. Murray and J.W. Szostak, 1983, *Nature***305**:89 və L. Clarke and J. Carbon, 1985, *Ann.Rew. Genet.***19**:29.

Sentromer Ardıcıllıqalr Uzunluğuna və Mürəkkəbliyinə Görə Çox Fərqlidir

Mitoz seqreqasiyasını təmin edən maya sentromer rayonları klonlaşdırıldıqdan sonra onların ardıcıllıqları təyin edilə və müqayisə oluna bildi. Nəticələr müxtəlif maya xromosomlarının sentromerləri arasında qorunub saxlanan konservativ üç rayonu (I, II və III) aşkar etdi (Şəkil 8-42a). Qısa, kifayət qədər yaxşı saxlanılmış konservativ ardıcıllıqlar I və III rayonlarda təmsil olunur. II rayon xüsusi ardıcıllıqlara malik deyil, amma AT ilə zəngindir və kifayət qədər sabit uzunluğa malikdir, böyük ehtimalla, I və III rayonlar xüsusiləşmiş sentromerlə assosasiyada olan histon oktamerin eyni tərəfində yerləşirlər. Bu xüsusiləşmiş sentromerlə assosasiyada olan histon oktamer H2A, H2B və H4 adi histonlara və H3 histonun variant formasına malikdir. Bütün eukariotların sentromerləri buna oxşar olaraq tərkibində xüsusiləşmiş, H3 histonun insanlarda CENP-A adlanan sentromer spesifik forması olan nukleosomlara malikdir. *S. cereviciae*-nin sadə kinetoxorunda CBF3 adlanan zülal kompleksi belə xüsusiləşmiş nukleosomla assosasiya edir. Öz növbəsində CBF3 kompleks Ndc80 adlanan elonqasiya etmiş çoxzülallı kompleksin bir sıra nüsxələri ilə assosasiya edir (Şəkil 8-42b). Ndc80 kompleksi ilkin olaraq şpindel mikroborucuqları ilə lateral qarşılıqı əlaqə yaradır və sonra da, mikroborucuqların ucu ətrafında halqanı formalaşdıran Dam1 komplekslə əlaqə yaradır (Şəkil 8-42c). Bu qarşılıqlı əlaqə sentromerin şpindel mitroborucuqlarının ucuna

bağlanması ilə nəticələnir. *S. cerevisiae* bu vaxta qədər təbiətdə məlum olan ən sadə sentromerə malikdir.

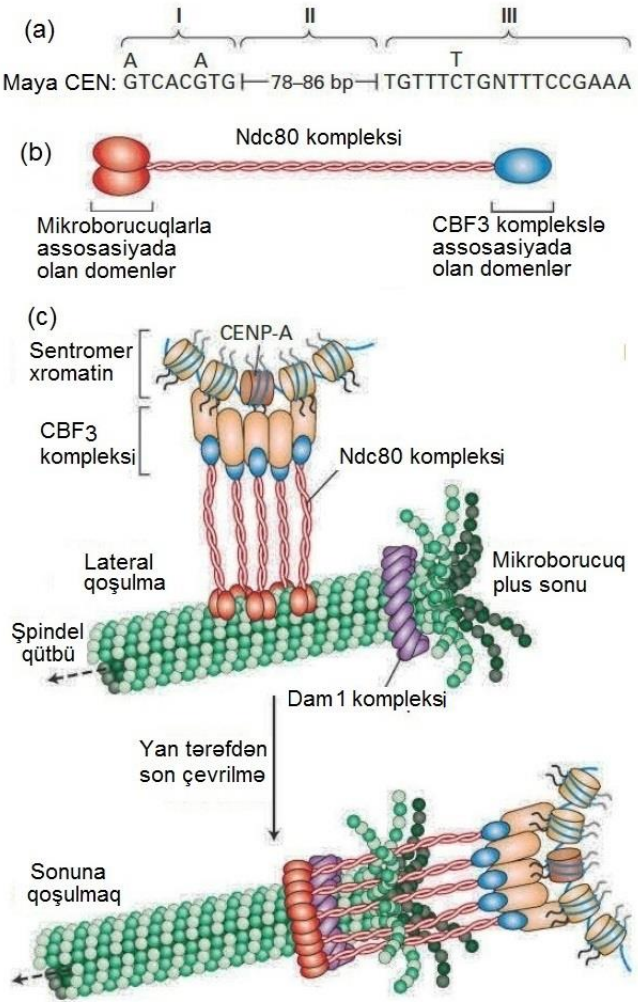
Bölünən maya *S. pombe*-də sentromerlər 40-100 kə uzunluqdadırlar və *S.cerevisiae* sentromerlərinə bənzər olaraq təkrarlanan nüsxələrdən təşkil olunmuşdur. *S. Cerevisiae* sentromerləri ilə qarşılıqlı əlaqədə olan zülallara homoloji olan zülalların çoxsaylı nüsxələri *S. pombe* sentromerlərin bu kompleksinə birləşir və öz növbəsində daha uzun *S. pombe* xromosomlarını mitoz spindel aparatının bir sıra mikroborucuqlarına birləşdirir. Bitkilərdə və heyvanlarda sentromerlər meqa-əsas uzunluqlarda olurlar və sadə ardıcıllıqlı DNT-nin çoxsaylı təkrarlarından təşkil olunublar. İnsanlarda sentromerlər, *alfoid (alphoid*) DNT adlandırılan 171 əc uzunluqda sadə ardıcıllıqlı DNT-nin 2-dən 4-ə qədər meqaəsas düzümlərinə malikdirlər, bunalar da CENP-A H3 histon variantına və eləcə də, digər təkrarlanan sadə ardıcıllıqlı DNT-yə malik olan nukleosomlarla birləşmişlər.

Ali eukariotlarda **kinetoxor** adlanan kompleks zülal quruluş mitoz zamanı sentromerlərdə toplanır və sonra çoxsaylı mitoz iy telləri (şpindel) ilə birləşir (bax Şəkil 18-40). Mayada tapılmış çoxsaylı sentromerlə assosasiyalı zülalların homoloqları insanda və başqa ali eukariotlarda da taplmışdır. Ali hüceyrələrdə amin turşuları ardıcıllığının müqayisəsinə görə təmiz homologiyası mövcud olmayan maya zülalları (məsələn, Dam1 kompleksi) üçün oxşar xassələrə malik olan alternativ komplekslərin kinetoxorlarda fəaliyyət göstərməsi ehtimal olunur. Sentromerlərin funksiyası və mitoz və meyoz bölünmədə qız xromatidlərin seqreqasiyası zamanı sentromerlərə birləşmiş kinetoxor zülalların funksiyası Fəsil 18 və 19-da təsvir edilmişdir.

Telomer Ardıcıllıqların Telomerazalarla Əlavə Olunması Xromosomların Qısalmasına Mane Olur

İnsan da daxil olmaqla, müxtəlif orqanizmlərdə telomerlərin ardıcıllığının oxunması göstərdi ki, onların əksəriyyəti xromosomların ucunda zəncirin 3′ sonluğunda yüksək dərəcədə G tərkibinə malik olan təkrarlanan oliqomerlərdir. İnsanlarda və başqa onurğalılarda telomer təkrarlanan ardıcıllıq TTAGGG-dir. Bu sadə ardıcıllıqlar xromosomların uc nahiyəsində mayada və protozoalarda bir neçə yüz əsas cütündən onurğalılarda bir neçə min əsas cütünə qədər təkrarlanırlar. G ilə zəngin zəncirin 3′ sonluğu komplementar C ilə zəngin zəncirin 5′ sonluğundan kənara 12-16 nukleotid ölçüdə uzanır. Bu rayon xətti xromosomun uclarını eqzonukleazaların hücumundan qoruyub saxlamaq üçün xüsusi zülallarla birləşirlər.

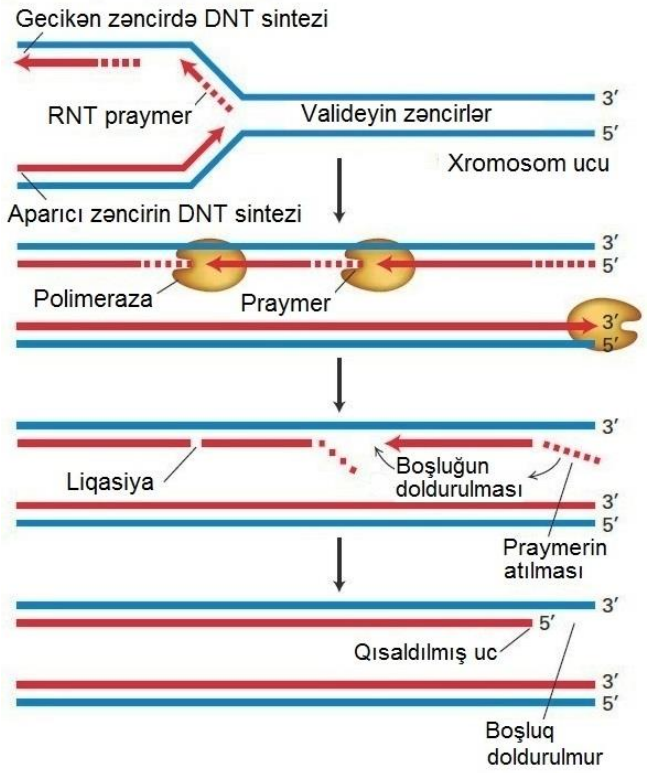
Eukariotik xromosomların uclarında xüsusiləşmiş rayonun nəyə görə lazım olmasını biz bütün məlum olan DNT polimerazaların DNT zəncirini 3′ sonluqda elonqasiya etdiyini və hamısının RNT və ya DNT praymerləri tələb etdiyini nəzərə alsaq aydın olur. Replikasiya çəngəli xətti xromosomun sonuna yaxınlaşdıqca aparıcı zəncirin sintezi DNT templeyt zəncirin sonuna doğru davam edir və bir ikiqat qız DNT zəncirini tamamlayır. Amma gecikən zəncir templeytin surətinın çıxarılması fasiləli olduğundan o bütövlükdə replikasiya oluna bilmir (Şəkil 8-43). Son RNT praymer uzaqlaşdırıldıqda DNT polimerazanın aradakı yaranan boşluğu doldurması üçün lazım olan yuxarıya istiqamətdə uzunayan zəncirdə olmur. Bəzi xüsusi mexanizmlər olmadan gecikən zəncirin sintezindən alınan qız DNT zənciri hər bir hüceyrə bölünməsi zamanı qısalmalı olardı.



ŞƏKİL 8-42 ***S. cerevisiae*-də kinetoxor-mikroborucuq qarşılıqlı əlaqələri.** (a) *S. cerevisiae*-nin sadə sentromerinin ardıcıllığı. Bax L. Clarke and J. Carbon, 1985, *Ann.Rev.Genet*. **19**:29. (b) Mikroborucuq və CBF3 kompleksl assosasiyada olan Ndc80 kompleksi. (c) Sentromerlə assosasiyada olan CBF3 kompleksinin və onunla assosasiyada olan və şpindel mikroborucuqlarının ucunda Dam1 zülalların halqası ilə birləşən Ndc80 komplekslərin diaqramı. Ndc80 kompleksləri əvvəlcə şpindl mikroborularının yanları ilə lateral qarşılıqlı əlaqə yaradırlar (*yuxarıda*) və sonra mikroborucuqlara uclardan qoşulan Dam 1 halqa (*aşağıda*) ilə assosasiya edirlər. Bax T.U. Tanaka, 2010, *EMBO J*. **29**:4070.

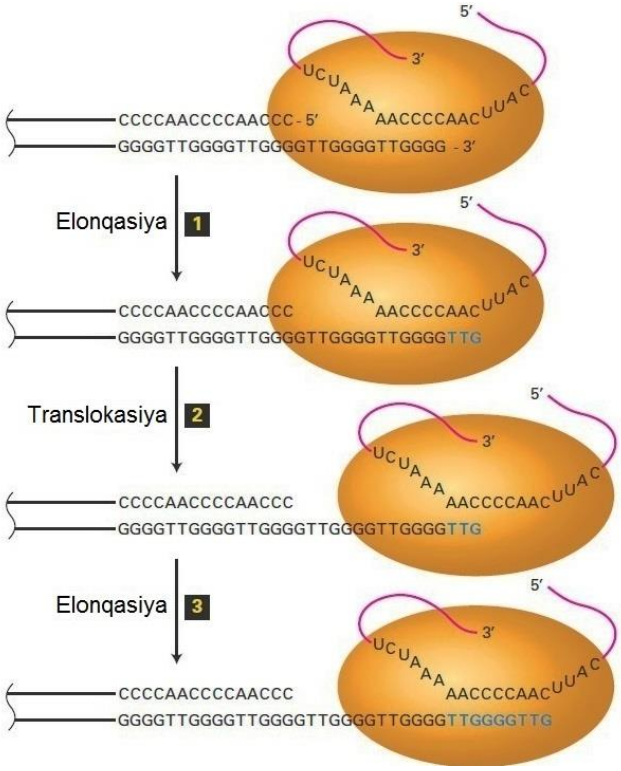
Telomer qısalması problemi hər bir xromosomun uclarına telomer (TEL) təkrarların ardıcıllığını əlavə edən ferment vasitəsi ilə həll olundu. Bu ferment zülal-RNT kompleksi olub, *telomer terminal ransferaza* və ya *telomeraza* adlanır. Telomeraza-assosasiyalı RNT-nin ardıcıllığı bizim görəcəyimiz kimi, dezoksiribonukleotidlərin telomerlərin uclarına əlavə olunması üçün templeyt kimi fəaliyyət göstərdiyindən, əlavə

olunan ardıcıllığı telomer DNT praymer mənbəyi deyil ferment mənbəyi təyin edir. Bu *Tetrahymena*-ya RNT ilə assosasiyada olan telomerazanı kodlaşdıran genin mutasiya olunmuş formasının transformasiyası ilə təsdiq olunmuşdur. Alınmış telomeraza telomer praymerlərin sonluğuna mutasiya olunmuş RNT ardıcıllığına komplementar olan DNT ardıcıllığını əlavə etmişdir. Beləliklə telomeraza geriyə transkriptazanın xüsusiləşmiş forması olub özünün daxili RNT templeytini birbaşa DNT sintezi üçün daşıyır. Bu eksperimet telomerazanın quruluşunun və funksiyasının açılmasına görə Fiziologiya və Tibb üzrə Nobel Mükafatına laiq görülmüşdir.



ŞƏKİL 8-43 Standart DNT replikasiyası xətti DNT molekulunun hər bir zəncirinin 5′ sonluğunda DNT itirilməsinə səbəb olur. Xətti DNT-nin sağ sonluğunun replikasiyası göstərilmişdir, eyni proses sol tərəfdəki sonluqda da baş verir (şəkilin çevrilməsi ilə göstərilə bildiyi kimi). Replikasiya çəngəli valideyin DNT molekulunun sonuna yaxınlaşdıqca aparıcı zəncir birbaşa valideyin trempleyt zəncirin sonuna qədər deoksiribonukleotidləri itirmədən sintez oluna bilir. Amma gecikən zəncirin sintezi RNT praymerlərini tələb etdiyindən gecikən qız DNT zəncirin sağ ucu ribonukleotidlərin atıldığı vəziyyətdə olur, ona görə də replikasiya edən DNT polimeraza üçün templeyt rolunu oynaya bilmir. Alternativ mexanizm istifadə olunmalıdır ki, gecikən zəncirin hər replikasiya dövrəsində ardıcıl davam edən qısalmanın qarşısı alınsın.

Şəkil 8-44 telomerazanın assosasiyada olduğu RNT-nin geriyə transkripsiyası yolu ilə tək zəncirli DNT-nin 3′-sonluğunu yuxarıda qeyd olunmuş G ilə zəngin zəncirdə necə elonqasiya etdiyini göstərir. Nokaut siçanın telomeraza ilə assosasiyada olan RNT-ni istehsal edə bilməyən hüceyrələri telomeraza fəallığını nümayiş etdirə bilmir, ona görə də onların telomerləri hər hüceyrə generasiyası zamanı ardıcıl şəkildə qısalır. Bu cür siçan uzun telomer ardıcıllıqlarının kifayət qədər qısalıb aradan çıxmasına qədər normal şəkildə üç nəsil çoxalıb arta bilir. Sonra telomer DNT-nin olmaması əlverişsiz mənfi təsirə, o cümlədən xromosom uclarının qovuşmasına və xromosom itirilmələrinə səbəb olur. Dördüncü nəsilə qədər bu nokaut siçanların çoxalıb artma potensialı kəskin aşağı düşür və onlar altıncı nəsildən sonra nəsil vermə qabliyyətini tamamilə itirirlər.



ŞƏKİL 8-44 Telomerazanın fəaliyyət mexanizmi. Xətti DNT-nin ən uc ardıcıllığını sintez etmək üçün DNT-nin replikasiya edə bilməmək mexanizminin əksinə olaraq telomerin bir zəncirli 3′-sonluğu telomeraza vasitəsi ilə uzanır. Telomeraza bu bir-zəncirli sonluğu təkrarlanan geriyə transkriptaza mexanizmi ilə uzadır. *Tetrahymena* protozoanın T_2G_4 təkrarlanan vahidi əlavə edən telomerazasının fəaliyyəti təsvir edilir, başqa telomerazalar bir-az fərqli ardıcıllıqları əlavə edir. Telomerazanın malik olduğu RNT templeyt (qırmızı) gecikən zəncir templeytin 3’ sonluğu ilə əsas cütü əmələ gətirir. Sonra telomerazanın katalitik mərkəzi, RNT molekulunu templeyt kimi istifadə edərək (pillə 1) dezoksiribonukleotidləri TTG (mavi) əlavə edir. Nəticədə əmələ gəlmiş DNT-RNT dupleksinin zəncirləri bir-birinə nisbətən elə sürüşürlər (translokasiya edirlər) ki, replikasiya etmiş DNT-nin 3′ sonluğunda TTG ardıcıllıq telomeraza RNT-nin komplementar RNT ardıcıllığı ilə əsas cütü əmələ gətirir (pillə 2). Replikasiya olunan DNT-nin 3′ sonluğu sonra yenidən telomeraza vasitəsilə uzanır (pillə 3). Telomeraza 2 və 3 pillələri təkrarlayaraq çoxsaylı təkrarları əlavə edə bilər. DNT polimeraza α-praymaza yeni Okazaki fraqmentlərinin sintezini bu uzunamış templeyt zəncir üzərində praymerlərlə həyata keçirə bilir. Son nəticədə, DNT replikasiyasının hər bir tsiklində gecikən zəncirin qısalmasının qarşısını alır. Bax C.W.Greider and E.H. Blackburn, 1989, *Nature* 3**37**:331.

İnsanın telomeraza zülalını və telomeraza ilə birləşən RNT-ni ekspressiya edən genləri rüşeym hüceyrələrində və sütun hüceyrələrdə fəaldır, amma yetkin toxumanın məhdud təkrarda bölünən əksər hüceyrələrində və ya bir də heç vaxt replikasiya etməyəcək hüceyrələrində (belə hüceyrələrə *postmitoz* hüceyrələr deyilir) dayandırılmışdır. Amma bu genlər insanın xərçəng hüceyrələrinin əksəriyyətində, o yerdə ki, şişləri yaratmaq üçün lazım olan çoxsaylı hüceyrə bölünmələrində telomeraza tələb olunur orada fəallaşır. Bu hadisə xərçəngə qarşı potensial müalicə agenti kimi insan telomerazalarının ingibitorlarının axtarışını stimullaşdırır.

Eukariotların əksəriyyətində telomerazalar telomerlərin qısalmasına mane olduğundan bəzi orqanizmlər alternativ strategiyadan istifadə edirlər. *Drosophila* növləri telomerin uzunluğunu qeyri-LTR retrotranspozonların telomerlərə tənzimlənən şəkildə keçirilməsi yolu ilə saxlayırlar. Bu mobil elementin sahib orqanizmdə xüsusi funksiyaya malik olduğu bir neçə nümunədən biridir.

8.6 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSIYALARI

Eukariotik Xromosomların Morfoloji və Funksional Elementləri

- Metafaza zamanı eukariotik xromosomlar kifayət qədər kondensasiya olunmuş vəziyyətdə olurlar, bu zaman onları fərdi olaraq işıq mikroskopunda da görmək mümükün olur.
- Xromosomal kariotip hər bir növ üçün spesifik olur. Çox yaxın qohum növlər dramatik dərəcədə fərqli kariotiplərə malik olurlar, bu göstərir ki, oxşar genetik məlumat xromosomlarda müxtəlif yollarla təşkil oluna bilərlər.
- Bənd əmələgətirmə analizləri və xromosom rəngləmələri insanın müxtəlif metafaza xromosomlarını identifikasiya etmək üçün və translokasiya və silinmələri (delesiyaları) aşkar etmək üçün istifadə olnurlar (bax Şəkil 8-37 və 8-38).
- Xromosomal yenidən qruplaşmanın və yaxın növlər arasında konservativ sinteni rayonların analizi alimlərə xromosomların təkamülü haqqında proqnozlar verməyə imkan verir (bax Şəkil 8-39c). Orqanizmlər arasında bu tədqiqatlarla göstərilmiş təkamül əlaqələri qazıntı qeydlərinə və DNT ardıcıllığının analizlərinə əsaslanmış güman olunan təkamül əlaqələri ilə uyğun gəlir.
- Politon xromosomların yüksək dərəcədə özünü artıra bilən bənd əmələgətirmə profili xromosomal silinmələri və yenidən qruplaşmaları bəndlərin normal profilindəki dəyişkənlik kimi vizuallaşdırmağı mümkün edir.
- Uzun xətti DNT molekulunun xromosom kimi fəaliyyət göstərməsi üçün üç tip DNT ardıcıllığı tələb olunur: mayada ARS adlandırılan replikasiya mənşəi (origin); sentromer (CEN) ardıcıllığı və DNT-nin uclarında iki telomer (TEL) ardıcıllıqları (bax Şəkil 8-41).
- Zülal-RNT kompleksi olan telomeraza, xüsusi DNT sintezi zamanı telomerlərin replikasiyasını tamamlayan geriyə transkriptaza fəallığına malikdir (bax Şəkil 8-44). Eukariotların əksəriyyətində telomerazalar olmasaydı, gecikən zəncirin sintezindən alınan qız DNT zənciri hər bir hüceyrə bölünməsi zamanı qısalardı (bax Şəkil 8-43).

Açar Sözlər

açıq oxunan çərçivə (ORF)
DNT transpozon
eqzon qarışması (shuffling)
euxromatin
fluoressent in situ hibridləşmə (FISH)
gen ailəsi
genomiks
heteroxromatin
histonlar
xromatid
xromatin
kariotip
LINE-lər
nukleosom
politen xromosom
psevdogenlər
retrotranspozon
sadə ardıcıllıqlı (satellit) DNT-lər
sentromer
SINE-lər
SMC zülallar
telomer
transkripsiya vahidi
transpozon (transposable) DNT elementi
Uzun terminal təkrarlar (LTR-lər)
zülal ailəsi

Konsepsiyaya Baxış

1. Zülal kodlaşdıran genlər mRNT-yə, ribosomal və ya digər RNT-lərin genləri isə həmin RNT-lərə transkripsiya oluna bilirlər. Geni təyin et. Növbəti xüsusiyyətlərinə görə onlar (a) davam edirlər, (b) sadədirlər və ya (c) mürəkkəb transkripsiya vahididirlər.
   (i) Eukariotlarda tapılanlar
   (ii) İntrona malikdirlər
   (iii) Verilmiş gendən yalnız bir zülal etmək qabliyyətinə malikdirlər.
2. İnsan genomunun oxunması genlərin təşkili barədə çox şeyləri aşkar etdi. Tənha genlər, gen ailələri, psevdogenlər və tandem təkrarlanan genlər arasındakı fərqləri təsvir edin.
3. İnsan genomunun çox hissəsi təkrarlanan DNT-dən təşkil olunub. Mikrosatellit və minisatellit DNT-lər arasındakı fərqi təsvir edin. Fərdlərin DNT finqerprintinqi metodu ilə

identifikasiyasında bu təkrarlanan DNT-lər necə əhəmiyyətlidir?
4. DNT kimi yeni sayta keçən və ya transpozisiya edən mobil DNT elementləri DNT transpozonlar adlanır. İnsersiya ardıcıllığı adlandırılan bakterial DNT transpozonun transpozisiya mexanizmini təsvir edin.
5. Retrotranspozonlatr mobil elementlərin RNT intermediatlarla transpozisiya edən bir sinifidir. Uzun terminal təkrara (LTR-lər) malik olan və LTR-lərə malik olmayan retrotranspozonlar arasında köçürülmə mexanizmindəki təzadları göstərin.
6. Müasir orqanizmlərin təkamülündə transpozonların oynadığı güman olunan rolu müzakirə edin. Eqzon qarışdırılması nədir? Eqzon qarışdırması prosesində transpozonlar hansı rolu oynayırlar?
7. Genlərin paraloqları və ortoloqları nədir? İnsanların həlqəvi qurd *C.elegans*-a nisbətən daha mürəkkəb orqanizm olmasının izahı nədir, hərçənd ki, onlarda genlərin sayı yalnız 5 faizə yaxın artıqdır (21000 qarşı 20000)?
8. DNT hüceyrədə xromatinləri formalaşdırmaq üçün zülallarla birləşmiş (assosasiyada) olur. Nukleosom nədir? Nukleosomlarda histonlar hansı rolu oynayırlar? Kondensasiya olunmuş 30 nm liflərdə nukleosomlar necə düzülürlər?
9. Xromatin modifikasiyaları transkripsiyanı necə tənzimləyir? Fəal transkripsiya gedən genom rayonunda hansı modifikasiyalar müşahidə olunur? Fəal transkripsiya getməyən rayonlarda necə?
10. FISH nədir? Onun necə işlədiyini qısaca izah et. Müəyyən genetik pozuntularla və xərçəngin xüsusi tipləri ilə bağlı olan xromosomal translokasiyanın səciyyələndirilməsində FISH necə istifadə olunur.
11. Xromosom rəngləmə nədir və bu metod necə istifadə olunur? Məməlilərin xromosomunun təkamülünün analizində xromosom rəngləyən problar necə istifadə oluna bilər?
12. Bəzi orqanizmlər daxilində politen xromosomlar olan hüceyrələrə malik olurlar. Politen xromosomlar nədir, onlar harada tapılmışlar və onlar hansı funksiyanı yerinə yetirirlər?
13. Eukariotik xromosomların replikasiyası və seqreqasiyası üç funksional elementi tələb edir: replikasiya mənşələri (origin), sentromer və telomerlər. Əgər bunlardan: (a) replikasiya mənşələri və ya (b) sentromer itərsə xromosoma necə təsir olunacaq?
14. DNT replikasiyası zamanı xromosom uclarında meydana gələn problemi təsvir et. Bu problemlə telomerlərin necə əlaqəsi var?

İstinadlar

Eukariotik Genin Quruluşu
Black, D. L. 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Ann. Rev. Biochem.* **72**:291–336.
Davuluri, R. V., et al. 2008. The functional consequences of alternative promoter use in mammalian genomes. *Trends Genet.* **24**:167–177.
Wang, E. T., et al. 2008. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**:470–476.

Genlərin və Kodlaşdırmayan DNT-nin Xromosomda Təşkili
Celniker, S. E., and G. M. Rubin. 2003. The *Drosophila melanogaster* genome. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* **4**:89–117.
Crook, Z. R., and D. Housman. 2011. Huntington's disease: can mice lead the way to treatment? *Neuron* **69**:423–435.
Feuillet, C., et al. 2011. Crop genome sequencing: lessons and rationales. *Trends Plant Sci.* **16**:77–88.
Giardina, E., A. Spinella, and G. Novelli. 2011. Past, present and future of forensic DNA typing. *Nanomedicine* (Lond.) **6**:257–270.
Hannan, A. J. 2010. TRPing up the genome: tandem repeat polymorphisms as dynamic sources of genetic variability in health and disease. *Discov. Med.* **10**:314–321.
International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**:931–945.
Jobling, M. A., and P. Gill. 2004. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Rev. Genet.* **5**:739–751.
Lander, E. S., et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**:860–921.
Todd, P. K., and H. L. Paulson. 2010. RNA-mediated neurodegeneration in repeat expansion disorders. *Ann. Neurol.* **67**:291–300.
Venter, J. C., et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science* **291**:1304–1351.

Transpozon (Mobil) DNT Elementləri
Curcio, M. J., and K. M. Derbyshire. 2003. The outs and ins of transposition: from mu to kangaroo. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:865–877.
Goodier, J. L., and H. H. Kazazian, Jr. 2008. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell* **135**:23–35.
Jones, R. N. 2005. McClintock's controlling elements: the full story. *Cytogenet. Genome Res.* **109**:90–103.
Lisch, D. 2009. Epigenetic regulation of transposable elements in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* **60**:43–66.

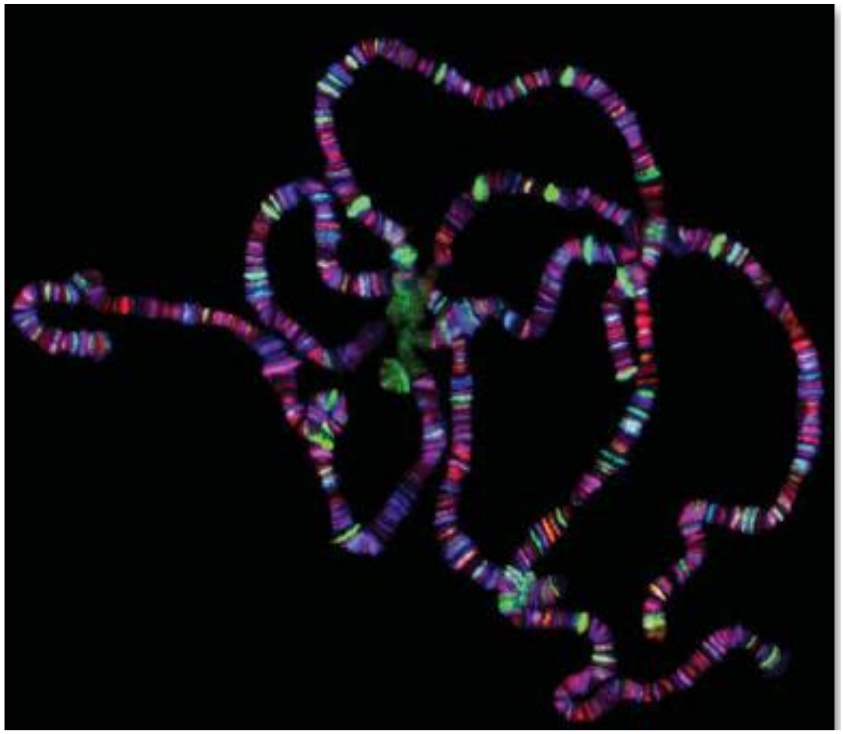
Genomiks: Gen Quruluşu və Funksiyasının Genom-Geniş Analizləri
BLAST Information can be found at: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.
1000 Genomes Project Consortium. 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* **467**:1061–1073.
Alkan, C., B. P. Coe, and E. E. Eichler. 2011. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nature Rev. Genet.* **12**: 363–376.
Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. 2005. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* **437**:69–87.
du Plessis, L., N. Skunca, and C. Dessimoz. 2011. The what, where, how and why of gene ontology—a primer for bioinformaticians. *Brief Bioinform.* **12**:723–735.
Ideker, T., J. Dutkowski, and L. Hood. 2011. Boosting signal-to-noise in complex biology: prior knowledge is power. *Cell* **144**:860–863.
Lander, E. S. 2011. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* **470**:187–197.
Mills, R. E., et al. 2011. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature* **470**:59–65.
Picardi, E., and G. Pesole. 2010. Computational methods for ab initio and comparative gene finding. *Meth. Mol. Biol.* **609**:269–284.
Ramskold, D., et al. 2009. An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data. *PLoS Comput. Biol.* **5**:e1000598.
Raney, B. J., et al. 2011. ENCODE whole-genome data in the UCSC genome browser (2011 update). *Nucl. Acids Res.* **39**: D871–D875.
Sleator, R. D. 2010. An overview of the current status of eukaryote gene prediction strategies. *Gene* **461**:1–4.
Sonah, H., et al. 2011. Genomic resources in horticultural crops: status, utility and challenges. *Biotechnol. Adv.* **29**:199–209.
Stratton, M. R. 2011. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science* **331**:1553–1558.
Venter, J. C. 2011. Genome-sequencing anniversary. The human genome at 10: successes and challenges. *Science* **331**:546–547.

Eukariotik Xromosomların Quruluş Təşkili

Bannister, A. J., and T. Kouzarides. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**:381–395.
Bernstein, B. E., A. Meissner, and E. S. Lander. 2007. The mammalian epigenome. *Cell* **128**:669–681.
Horn, P. J., and C. L. Peterson. 2006. Heterochromatin assembly: a new twist on an old model. *Chromosome Res.* **14**:83–94.
Kurdistani, S. K. 2011. Histone modifications in cancer biology and prognosis. *Prog. Drug Res.* **67**:91–106.
Luger, K. 2006. Dynamic nucleosomes. *Chromosome Res.* **14**:5–16.
Luger, K., and T. J. Richmond. 1998. The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Devel.* **8**:140–146.
Nasmyth, K., and C. H. Haering. 2005. The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Ann. Rev. Biochem.* **74**:595–648.
Schalch, T., et al. 2005. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* **436**:138–141.
Woodcock, C. L., and R. P. Ghosh. 2010. Chromatin higherorder structure and dynamics. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2**:a000596.

Eukariotik Xromosomların Morfologiyası və Funksional Elementləri

Armanios, M., and C. W. Greider. 2005. Telomerase and cancer stem cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.***70**:205–208.
Belmont, A. S. 2006. Mitotic chromosome structure and condensation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**:632–638.
Blackburn, E. H. 2005. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett.* **579**:859–862.
Cvetic, C., and J. C. Walter. 2005. Eukaryotic origins of DNA replication: could you please be more specific? *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**:343–353.
Froenicke, L. 2005. Origins of primate chromosomes as delineated by Zoo-FISH and alignments of human and mouse draft genome sequences. *Cytogenet. Genome Res.* **108**:122–138.
MacAlpine, D. M., and S. P. Bell. 2005. A genomic view of eukaryotic DNA replication. *Chromosome Res.* **13**:309–326.
Ohta, S., et al. 2011. Building mitotic chromosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**:114–121.
Tanaka, T. U. 2010. Kinetochore-microtubule interactions: steps towards bi-orientation. *EMBO J.* **29**:4070–4082.



FƏSIL
9

Genlərin Ekspressiyasına Transkipsiya Nəzarəti

Drosophila-nın politen xromosomları Kismet adlanan xromatin remodelinq ATP-azaya qarşı anticismlə rənglənmişdir (mavi), RNT polimeraza II aşağı CTD fosforlaşma ilə (qırmızı) və RNT polimeraza II yüksək CTD fosforlaşma ilə (yaşıl). [The Company of Biologist razılığı ilə Srinivasan, S., et al., "The *Drosophila* trithorax group protein Kismet facilitates an early step in transcriptional elongation by RNA Polymerase II," *Development*, 2005, **132**(7):1623-1635-dən reproduksiya olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc vasitəsilə alınmışdır.]

Əvvəlki fəsillərdə biz gördük ki, hər bir hüceyrə tipinin xassəsi və funksiyası onun malik olduğu zülallarla təyin edilir. Bu və növbəti fəsildə biz, çoxhüceyrəli orqanizmlərdə xüsusi bir hüceyrə tipi tərəfindən istehsal olunan zülalların müxtəlif növləri və miqdarlarının necə tənzimlənməsinə baxacağıq. ***Gen ekspressiyasının*** bu tənzimlənməsi fundamental proses olub, bizim özümüz kimi çoxhüceyrəli orqanizmlərin, mayalanmış tək bir yumurta hüceyrəsindən başlayaraq bizim özümüzü təşkil edən minlərlə hüceyrə tipinə qədər inkişafına nəzarət edir. Genlərin ekspressiyası yox olanda hüceyrənin xassəsi dəyişir və bu proses çox hallarda xərçəng xəstəliyinin yaranmasına gətirib çıxarır. İrəlidə Fəsil 24-də təsvir olunduğu kimi, normal halda hüceyrənin inkişafını məhdudlaşdıran zülalları kodlaşdıran genlər xərçəng hüceyrələrində repressiya olunurlar, amma, hüceyrənin inkişfını və bölünməsini sürətləndirən zülalları kodlaşdıran genlər isə xərçəng hüceyrələri tərəfindən lazımsız dərəcədə fəallaşır. Genlərin ekspressiyasında anormallıq, həmçinin, inkişafın qüsurunda, məsələn dovşan dodaqlılıq, Fallot tetralogiyası (ürəkdə cərrahi yolla müalicə oluna bilən ciddi inkişaf qüsuru) və çox sayda başqaları yaranır. Genlərin ekspressiyasının tənzimlənməsi bakteriyalarda və digər birhüceyrəli mikroorqanizmlərin inkişafında da həyati əhəmiyyətli rol oynayır, belə ki, o hüceyrələrə imkan verir ki, özlərinin ətraf mühitindəki qida və fiziki çatışmazlığa uyğun olaraq fermentativ mexanizmlərini və quruluş komponentlərini tənzimləsinlər. Nəticədə, mikroorqanizmlərin onları əhatə edən mühitə necə cavab verdiyini və çoxhüceyrəli orqanizmlərin normal halda necə inkişaf etdiyini, və eləcə də genlərin ekspressiyasında patoloji anormallığın necə baş verdiyini anlamaq üçün zülal istehsalına nəzarət edən molekulyar qarşılıqlı əlaqələri başa düşmək lazımdır.

Genlərin ekspressiyasının əsas mərhələləri, yəni, xüsusi bir gendə kodlaşdırılan informasiyanın xüsusi bir zülala deşifrə olunmasının tam prosesinə Fəsil 5-də baxılmışdır. mRNT-nin sintezi tələb edir ki, ***RNT polimeraza*** transkripsiyanı başlasın (**inisiasiya**), DNT-nin kodlaşdırıcı zəncirinə komplementar olaraq ribonukleozid trifosfatları polimerləşdirsin (**elonqasiya**), və transkripsiyanı başa çatdırsın (**terminasiya**) (bax Şəkil 5-11). Bakteriyalarda, ribosomların və translyasiyanın-inisiasiyası faktorlarının, yeni sintez olunan və heç bir növbəti modifikasiyaya uğramadan mRNT kimi fəaliyyət göstərən RNT transkriptə birbaşa çıxışı var. Amma, eukariotlarda, ilkin RNT transkript prosessinqə məruz qalır və nəticədə funksional mRNT alınır (bax Şəkil 5-15). Sonra mRNT, onun sintez olunduğu mərkəzdən, nüvədən sitoplazmaya daşınır və burada o ribosomların, tRNT-lərin və translyasiya faktorlarının köməyi ilə zülala translyasiya olunur (bax Şəkil 5-23, 5-24 və 5-26).

QISA ICMAL

9.1 Bakteriyalarda gen ekspressiyasına nəzarət

9.2 Eukariotlarda gen nəzarətinə ümumi baxış

9.3 RNT Polimeraza II Promotorlar və Ümumi Transkripsiya Faktorları

9.4 Zülal Kodlaşdıran Genlərdə Tənzimləyici Ardıcıllıqlar və Onların Fəaliyyət Göstərdiyi Zülallar

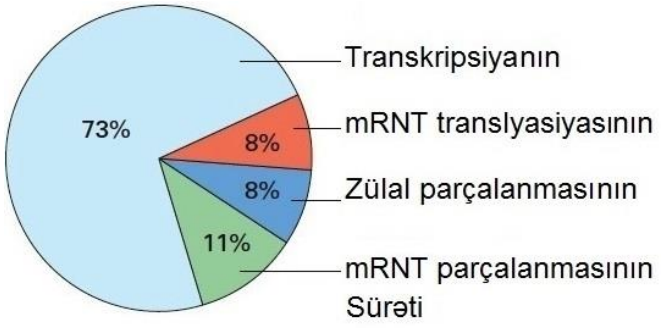
9.5 Transkripsiyanın Repressiyasının və Fəallaşmasının Molekulyar Mexanizmləri

9.6 Transkripsiya Faktorları Fəallığının Tənzimlənəsi

9.7 Transkripsiyanın Epigenetik Tənzimlənməsi

9.8 Başqa Eukariotik Transkripsiya Sistemləri

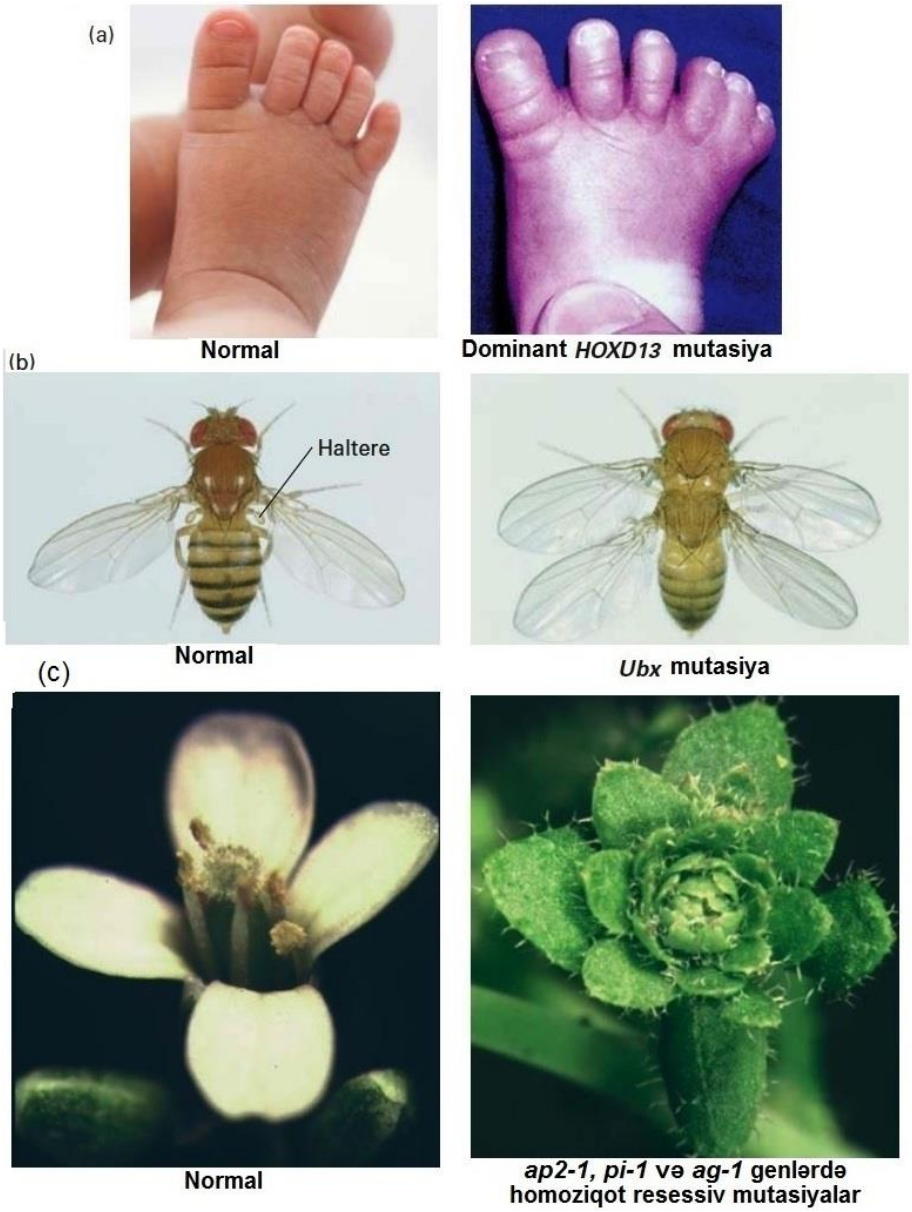
Tənzimlənmə gen ekspressiyasının yuxarıda göstərilən müxtəlif mərhələlərinin bir neçəsində baş verə bilər: transkripsiyanın inisiasiyasında, elonqasiyasında, RNT prosessinqində, mRNT-nin nüvədən sitoplazmaya daşınmasında və onun zülala translyasiyası mərhələlərində. Bu müxtəlif hüceyrə tiplərində və ya inkişafın müxtəlif mərhələlərində və ya xarici şəraitə cavab olaraq *differensial* zülal istehsalı ilə nəticələnir. Baxmayaraq ki, gen ekspressiyasının hər bir mərhələsində tənzimləməyə aid misallar tapılmışdır, birinci iki mərhələyə – transkripsiyanın inisiasiyasına və elonqasiyasına nəzarət – genlərin çoxunun ekspressiya olunub olunmadığını və nə qədər kodlaşdırılmış mRNT-lərin və uyğun olaraq zülalların istehsal olunduğunu təyin etmək üçün daha əhəmiyyətli olan mexanizmlərdir (Şəkil 9-1). Transkripsiyanın inisiasiyasını və elonqasiyasını tənzimləyən molekulyar mexanizmlər bir sıra bioloji proseslər üçün, o cümlədən, yuxarıda qeyd olunduğu kimi, çoxhüceyrəli orqanizmlərin mayalanmış vahid bir yumurtadan inkişafı, bizi patogenlərdən və mikro-orqanizmlərdən qoruyan immun cavab reaksiyası, yaddaş və öyrənmək kimi sinir prosesləri üçün kritik əhəmiyyət kəsb edir.



ŞƏKİL 9-1 Zülalların qatılığını tənzimləyən əsas proseslərin töhfəsi. Zülalın qatılığı zülalı kodlaşdıran mRNT-nin sintezi (genin transkripsiyası) tezliyinin, mRNT-nin parçalanması sürətinin, mRNT-nin zülala translyasiyası sürətinin və zülalın özünün parçalanması sürətinin tənzimlənməsi ilə nəzarət olunur. Kultura olunan siçan fibriblastlarında minlərlə zülalın qatılığının təyin olunmasında bu dörd dərəcənin nisbi töhfələri mass spektrometriya yolu ilə zülalın qatılığını ölçməklə (bax Fəsil 3), mRNT ardıcıllığının oxunması (mRNA-seq) ilə mRNT səviyyəsinin ölçülməsi ilə (bax Fəsil 6), mRNT-ni ribosomla assosasiya edərək ribonukleaza ilə dağıdılmaqdan müdafiə edərək translyasiyanın sürətinin hesablanması ilə, xarakterik yanlışlıqların və səhvlərin düzəldilməsi üçün verilənlərin statistik analizi ilə təyin edilmişdir. [Verilənlər J.J. Li and M.D. Biggin, 2014, Science **347**:1066-dan.]

Bu requlyator mexanizmlər transkripsiyanın funksiyasına düzgün nəzarət etməyəndə patoloji proseslər meydana gəlir. Məsələn, *HOXD13* genində dominant mutasiya p*olidaktil*, embrional inkişafda ayaqlarda və əllərdə və ya hər ikisində əlavə barmaqların əmələ gəlməsi baş verir (Şəkil 9-2a). *HOXD13* geni normal halda ətrafların inkişafında iştirak edən çoxsaylı genlərin transkripsiyasını tənzimləyən transkripsiya faktorunu kodlaşdırır. Transkripsiya faktorlarının fəaliyyətinə təsir edən mutasiyaların başqa bir nümunəsi *Drosophila*-da əlavə bir cüt qanadların yaranmasına (Şəkil 9-2b), bitkilərdə çiçəyin quruluşunun dəyişilməsinə (Şəkil 9-2c) və inkişafın bir çox başqa anormallığına səbəb olur.

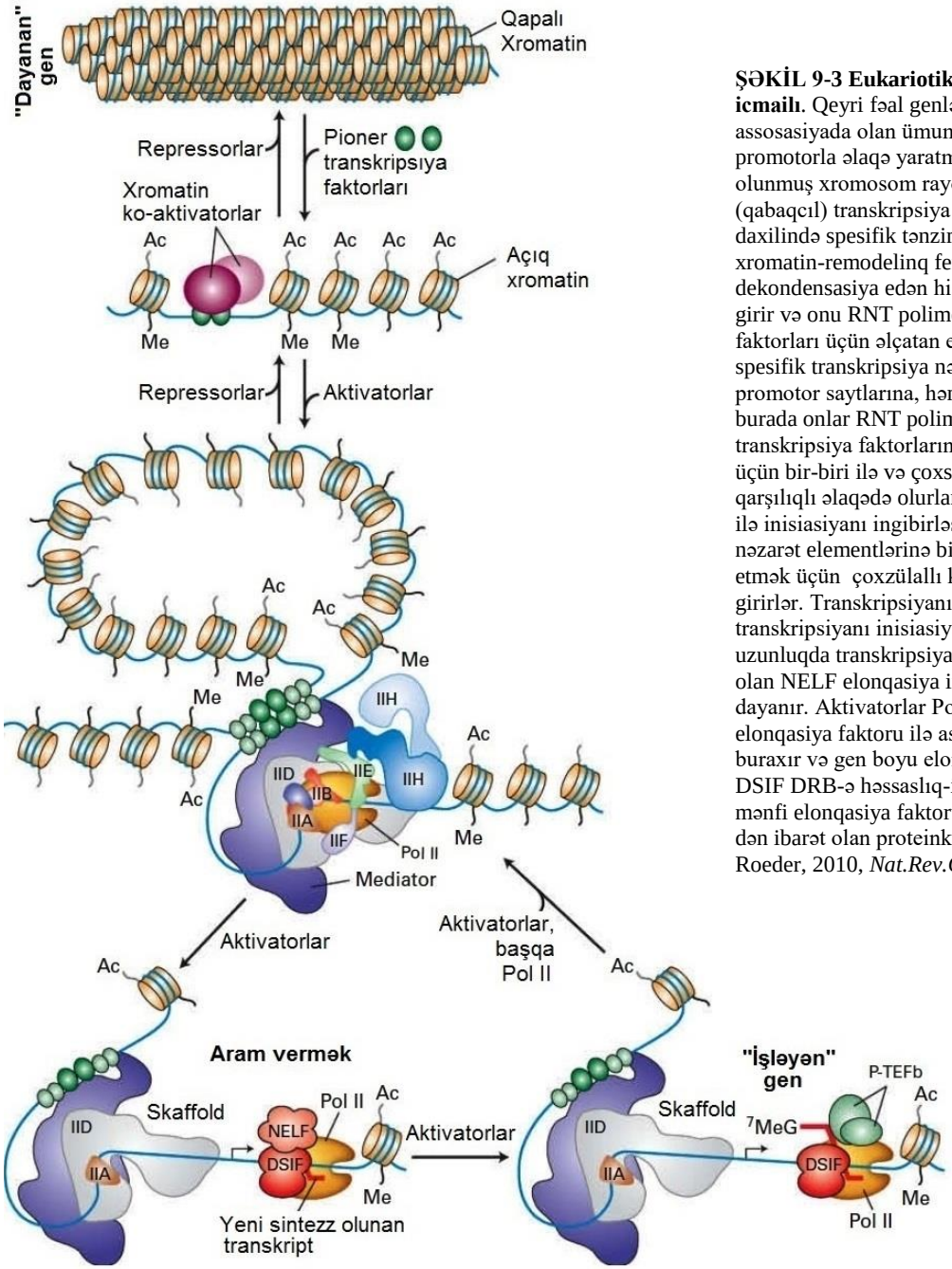
Transkripsiya mürəkkəb proses olub çoxtəbəqəli tənzimləməyə malikdir. Bu fəsildə, bizim diqqətimiz, genin transkripsiyasının nə vaxt baş verərəcəyini təyin edən molekulyar hadisələrə cəmlənəcək. Birincisi, biz, DNT-nin histonlarla birləşmədiyi və nukleosomlara bükülmədiyi bakteriyalarda gen ekspressiyasına baxacağıq. **Repressor** və **aktivator** zülallar yaxınlıqda yerləşən genin transkripsiyasına nəzarət etmək üçün DNT-nin xüsusi rayonunu tanıyır və ona birləşir, çox hallarda yeni sintez olunan mRNT-nin ribokeçiricilər adlandırılan üçüncü quruluşu transkripsiyanın elonqasiyasını tənzimləmək üçün metabolitlərlə birləşir. Fəsilin qalan hissəsi diqqəti eukariotlarda transkripsiyanın tənzimlənməsinə və bakterial tənzimlənmənin əsas ehkamının ali orqanizmlərin daha mürəkkəb yoluna necə tətbiq oluna biləcəyinə cəmləyir. Bundan başqa, bu mexanizmlər, transkripsiyanı tənzimlənməsi zamanı müxtəlif dərəcədə kondensasiya olunmuş xromatin quruluşunu əmələ gətirmək üçün histon quyruqlarının asetilləşmə və metilləşmə kimi post-translyasiya modifikasiyalarını, DNT-nin histon oktamerlərlə birləşməsini də istifadə edir (bax Şəkil 8-26). Şəkil 9-3 metazoanlarda (çoxhüceyrəli heyvanlarda) transkripsiyanın tənzimlənməsinin ümumi görünüşünü və bu fəsildə təqdim olunan prosesləri təsvir edir. Biz, xüsusi DNT ardıcıllıqlarının transkripsiya faktorları üçün biləşmə saytları kimi xidmət edərək **transkripsiyanın nəzarət-rayonları** kimi necə fəaliyyət göstərdiyini və DNT templeytə komplementar olaraq RNT molekulunun sintezi üçün RNT polimerazaların transkripsiyanın **promotor** ardıcıllığına birləşməsinə necə cavabdeh olmasını müzakirə edirik. Sonra, biz aktivatorların və repressorların böyük çoxzülallı komplekslərlə qarşılıqlı təsir vasitəsi ilə transkripsiyaya necə təsir etdiklərinə baxacağıq. Bu çoxzülallı komplekslərin bəziləri xromatin kondensasiyasını modifikasiya edir və xromosom DNT-nin transkripsiya faktorlarına və RNT polimerazaya əlçatanlığını dəyişir. Başqa komplekslər RNT polimerazanın transkripsiyanın başlanma saytında DNT-yə birləşmə dərəcəsini və eləcə də inisiasiya etmə tezliyinə birbaşa təsir edir. Tamamilə son zamanların tədqiqatları aşkar etdi ki, çoxhüceyrəli heyvanlarda, çox genlər üçün RNT ploimeraza



ŞƏKİL 9-2 Transkripsiya faktorlarını kodlaşdıran genlərdəki mutasiyaların fenotipləri. (a) İnsanın *HOXD13* genində dominant mutasiya polidaktil kimi məlum olan əlavə barmaqların əmələ gəlməsi ilə nəticələnir. (b) *Drosophila*-nın üçüncü döş seqmentində *Ubx* genin ekspressiyasına mane olan homoziqot mutasiya, normal halda halter adlanan tarazlayıcı orqanı inkişaf etdirən üçüncü seqmentin, qanadları inkişaf etdirən döş seqmentinin ikinci nüsxəsinə transformasiyası olunmaqla nəticələnir. (c) *Arabidopsois thaliana*-da üç floral orqan-identifikasiya edən genlərin hər iki nüsxəsini fəalsızlaşdıran mutasiyalar çiçəyin normal hissəsini yarpağabənzər quruluşa çevirir. Hər bir halda, bu mutasiyalar, çoxsaylı genləri, o cümlədən başqa transkripsiya faktorlarını kodlaşdıran genləri tənzimləyən əsas tənzimləyici transkripsiya faktorlarına təsir edir.[(a) hissəsi, *solda*, Lightvision, LLC/Moment Open/Getty Images; *sağda,* Goodman,F. R. and Scrambler, P. J., Human HOX gene mutations. *Clinical Genetics*, 2001, **59**:1, ss. 1–11. (b) hissəsi "The bithorax complex: the first fifty years," by Edward B. Lewis, *The International Journal ofDevelopmental Biology*, 1998, Vol **42**(403-15), Figures 4a and 4b razılığı ilə reproduksiya olunmuşdur. (c) hissəsi Elsevier razılığı ilə Weigel, D. and Meyerowitz, M., "TheABCs of floral homeotic genes," *Cell*, 1994, **78** (2):203-209-dan yenidən çap olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc vasitəsilə alınmışdır.]

RNT-nin qısa bir hissəsini transkripsiya etdikdən sonra aram verib dayanır və transkripsiya tənzimlənməsi mexanizmlərindən biri aram verən polimerazanı azad edərək onun genin qalan hissəsini transkripsiya etməsinə imkan verir. Biz xüsusi genlərin transkripsiyasının, insan genomunda kodlaşdırılan təxminən 1400 transkripsiya faktorlarının xüsusi kombinasiyaları tərəfindən necə dəqiqləşdirildiyini və hüceyrə tipi-spesifik gen ekspressiyasını yaratmasını müzakirə edirik. Biz, genlərin ekspressiyasının düzgün hüceyrə tipində və onların differensasiyasının düzgün zamanında baş verdiyinə əmin edən, transkripsiya faktorlarının özlərinin fəallıqlarının nəzarət olunduğu müxtəlif yollara baxacağıq.

Biz həmçinin, nüvədə RNT-zülal komplekslərinin transkripsiyanı tənzimləyə bildiyini aşkar edən son zamanların tədqiqatlarını da müzakirə edəcəyik. DNT-nin ardıcıllığının oxunmasında yeni metodlar RNT-nin DNT-yə in vitro geriyə transkripsiyası ilə birləşdirildikdə aşkar edildi ki, eukariotların genomunun çoxu zülal kodlaşdırmayan az zənginliyə malik olan RNT-lərə transkripsiya olunurlar. Son zamanlar aşkar edilmişdir ki, bir sıra nüvə *uzun kodlaşdırmayan RNT-lər* (*lncRNT*) digər zülal kodlaşdıran genlərin transkripsiyasını tənzimləyir. Bu kəşflər kodlaşdırmayan RNT-lərin transkripsiyaya nəzarətinin hazırkı zamanda başa düşüldüyündən daha çox ümumi ola biləcəyi ehtimalını artırır. Müxtəlif hüceyrə tiplərində transkripsiya faktorlarının bütün genom boyu xromatinin spesifik rayonları ilə assosasiyasının xəritələşdirilməsində son zamanlardakı irəliləyişlər transkripsiya faktorlarının embrionun erkən dövrünün pluripotent sütun hüceyrələrdən bütün toxumaları əmələ gətirən tam differensasiya etmiş hüceyrələrə qədər necə tənzimləməsinin ilk təsəvvürlərini təmin etmişdir. Eukariotlarda RNT prosessinqi və gen ekspressiyasına nəzarət edən başqa müxtəlif posttranskripsiya mexanizmləri növbəti fəsildə verilmişdir. Sonraki fəsillər, xüsusən də, 15, 16, və 21-ci fəsillər transkripsiyanın hüceyrələr arasındakı qarşılıqlı əlaqələrlə necə tənzimləndiyini nümunələrlə təqdim edir və nəticədə yaranmış **gen nəzarəti**nin çoxhüceyrəli orqanizmlərdə spesifik hüceyrə tiplərinin inkişafına və funksiyasına necə kömək etdiyini göstərir.



ŞƏKİL 9-3 Eukariotik transkripsiyaya nəzarətinin icmaili. Qeyri fəal genlər, RNT polimerazaların və onlarla assosasiyada olan ümumi transkripsiya faktorlarının promotorla əlaqə yaratmasını ingibirləşdirən kondensasiya olunmuş xromosom rayonlarında toplanmışlar. Pioner (qabaqcıl) transkripsiya faktoru kondensasiya etmiş xromatin daxilində spesifik tənzimləyici ardıcıllığa birləşə bilir və xromatin-remodelinq fermentləri və xromatini dekondensasiya edən histon asetilazlarla qarşılıqlı əlaqəyə girir və onu RNT polimeraza II və ümumi transkripsiya faktorları üçün əlçatan edir. Əlavə fəallaşdırıcı zülallar sonra spesifik transkripsiya nəzarət elementlərinə, həm yaxın promotor saytlarına, həm də uzaq enhanserlərə birləşir, burada onlar RNT polimeraza II (Ppol II) və əsas transkripsiya faktorlarının promotor üzərində toplanması üçün bir-biri ilə və çoxsubvahidli Mediator kompleksl qarşılıqlı əlaqədə olurlar. Alternativ olaraq, RNT polimeraza ilə inisiasiyanı ingibirləşdirmək üçün repressor zülallar başqa nəzarət elementlərinə birləşirlər və xromatini kondensasiya etmək üçün çoxzülallı ko-repressorla qarşılıqlı əlaqəyə girirlər. Transkripsiyanın fəallaşması zamanı Pol II transkripsiyanı inisiasiya edir, amma 100-dən az nukleotid uzunluqda transkripsiya etdikdən sonra DISF ilə assosasiyada olan NELF elonqasiya ingibitorunun təsiri ilə aram verib dayanır. Aktivatorlar Pol II-NELF-DSIF kompleksin P-TEFI elonqasiya faktoru ilə assosasiyasını təşviq edir, NELF-i buraxır və gen boyu elonqasiyanın getməsinə imkan verir. DSIF DRB-ə həssaslıq-induksiya edən faktordur, NELF mənfi elonqasiya faktorudur, P-TEFb isə CDK9 və tsiklin T-dən ibarət olan proteinkinazadır. Bax S.Malik and R.G. Roeder, 2010, *Nat.Rev.Genet*. **11**:761.

9.1 Bakteriyalarda Gen Ekspressiyasına Nəzarət

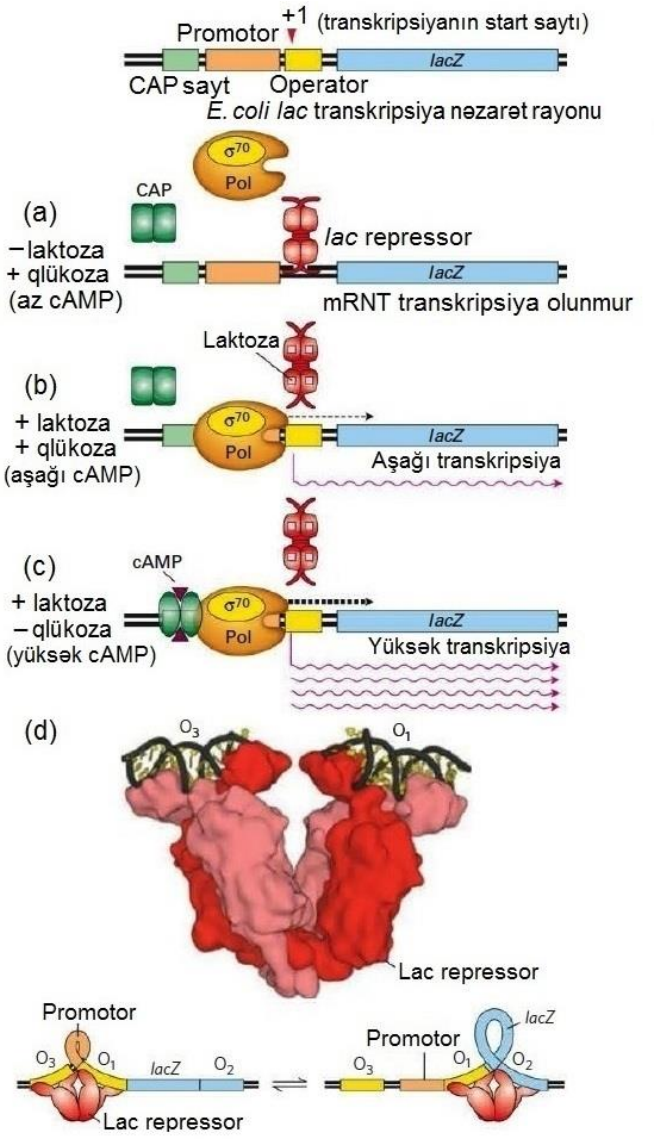
Hüceyrənin quruluşu və funksiyası onu təşkil edən zülallar tərəfindən təyin edildiyindən gen ekspressiyasına nəzarət molekulyar hüceyrə biologiyasının fundamental aspektidir. Çox hallarda, müəyyən bir zülalı kodlaşdıran genin transkripsiya olunması üçün "qərar" hüceyrədə kodlaşdırılmış zülalın istehsalına nəzarət üçün əsas mexanizmdir. Transkripsiyanı nizamlamaqla, hüceyrə hansı zülalı sintez edəcəyini və onların necə sürətlə istehsal edəcəyini tənzimləyə bilir. Genin transkripsiyası *repressiya* olunanda, müvafiq mRNT və kodlaşdırılmış zülal və ya zülallar aşağı sürətlə sintez olunurlar. Əksinə, genin transkripsiyası *fəallaşdırılanda* həm mRNT həm də onun kodlaşdırdığı zülal və ya zülallar daha yüksək sürətlə istehsal olunurlar.

Bakteriyaların əksəriyyətində və başqa birhüceyrəli orqanizmlərdə, hüceyrənin fermentativ mexanizmlərini və quruluş komponentlərini mühitin qida və fiziki dəyişkənliyinə uyğunlaşdırmaq üçün genlərin ekspressiyası yüksək dərəcədə tənzimlənir. Beləliklə, istənilən verilmiş zaman daxilində bakterial hüceyrə normal halda, yalnız onun verilmiş xüsusi şəraitdə sağ qalıb yaşaması üçün tələb olunan zülalları sintez edir. Burada biz, bakteriyalarda transkripsiyanın nəzarətinin əsas xüsusiyyətlərini, bizim əsas nümunələrimiz kimi *E. coli*-də *lac* operonu və qlutamin sintetaza genini və *Basillus subtilis*-də *xpt-pbuX* operonunu istifadə etməklə təsvir edirik. Eyni xüsusiyyətlərin çoxu, bu fəslin qalan hissələrinin mövzusu olacaq eukariotlarda da transkripsiyanın nəzarətində iştirak edir.

Transkripsiyanın Bakterial RNT Polimeraza ilə İnisiasiyası Siqma Faktorla Assosasiyanı Tələb Edir

E. coli-də təxminən genlərin yarısı klastr şəkilində **operon**larda yığılmışdır, onlardan hər biri xüsusi metabolik yola daxil olan fermentləri və ya çoxsubvahidli zülalları təşkil edən müxtəlif subvahid zülallarını kodlaşdırır. Məsələn, Fəsil 5-də müzakirə olunan *trip* operon triptifanın sintezində lazım olan beş polipeptidi kodlaşdırır (bax Şəkil 5-13). Buna oxşar olaraq, *lac* operon, süddə olan laktoza şəkərinin metabolizmi üçün lazım olan üç zülalı kodlaşdırır. Bakterial operon bir start saytından başlayaraq bir mRNT-yə transkripsiyaya olunduğundan, bir operonda olan bütün genlər **koordinasiya olunan tərzdə tənzimlənir,** ona görə də onların hamısı eyni dərəcədə fəallaşır və ya repressiya olunurlar.

Operonun transkripsiyası, eləcə də ayrılmış genlər RNT polimeraza ilə spesifik aktivator və reperessor zülallar arasındakı qarşılıqlı təsir ilə nəzarət olunur. Amma, transkripsiyanı inisiasiya etmək üçün *E. coli* RNT polimeraza az sayda olan **σ** (*siqma*) *faktorlardan* biri ilə assosasiyaya girməlidir. Eubakterial hüceyrələrdə ən çox rast gəlinən siqma faktor σ^{70}-dir. σ-faktor RNT polimerazaya və DNT-nin promotor ardıcıllığına birləşərək RNT polimeraza fermentini promotora gətirir. O transkripsiyanın +1 başlanğıc (start) saytından həm təxminən 10 əc məsafədə mərkəzləşən altı-əsas-cütlü ardıcıllığı həm də təxminən 35 əc məsafədə mərkəzləşən yeddi-əsas-cütlü ardıcıllığı tanıyır və ona birləşir. Nəticə etibarı ilə, –10 ilə –35 ardıcıllıqlar *E. coli* RNT polimerazanın σ^{70}



ŞƏKİL 9-4 *E. coli*-nin lac operonunda transkripsiyanın tənzimlənməsi. (*Yuxarıda*) Təxminən 100 əsas cütündən ibarət olan transkripsiyaya-nəzarət rayonuna üç zülal-birləşdirən rayonlar daxildir: katabolit aktivator zülalı birləşdirən CAP sayt, σ^{70}-RNT polimeraza kompleksini birləşdirən *lac* promotor, və *lac* repressoru birləşdirən *lac* operator. Operonda üç gendən birinci, β-qalaktozidaza fermentini kodlaşdıran *lac* Z geni sağ tərəfdə göstərilmişdir. (a) Laktoza olmayan halda çox az *lac* mRNT sintez olunur, çünki *lac* repressor operatora birləşir, transkripsiyanın σ^{70}-RNT polimeraza ilə inisiaiyasını ingibirləşdirir. (b) Qlükoza və laktoza olan halda, *lac* repressor laktozaya birləşir və operatordan dissosasiya edir, σ^{70}-RNT polimerazaya transkripsiyanı aşağı səviyyədə inisiasiya etməyə imkan verir. (c) *lac* operonun maksimal transkripsiyası laktozanın olduğu və qlükozanın olmadığı halda baş verir. Bu halda, qlükozanın aşağı qatılığına cavab olaraq cAMP artır və CAP saytına birləşən CAP-cAMP kompleksini yaradır və burada RNT polimeraza ilə qarşılıqlı əlaqəyə girib transkripsiyanın inisiasiyasının tezliyini artırır. (d) Tetramer *lac* repressor eyni zamanda əsas *lac* operatora (*O*1) və eyni zamanda ikinci dərəcəli operatorlardan (*O*2 və ya *O*3) birinə birləşir. Bu iki quruluş tarazlıqda olur. Bax B. Muller-Hill, 1998, *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:145. [(d) hissəsi M. Lewis et al., 1996, *Science* **271**:1247-1254, PDB IDs 1lbh and 1lbg; and R. Daber et al., 2007, *J. Mol. Biol.* **370**:609-619-dan, PDB ID 2pe5.]

faktorla assosasiyada olduğu promotoru təşkil edir (bax Şəkil 5-10b). Baxmayaraq ki, σ^{70} ilə əlaqədə olan promotor ardıcıllığı –35 və –10 arasında yerləşir, *E coli*-nin RNT polimerazası DNT promotor-rayonuna təxminən –50-dən +20 qədər ölçüdə olan DNT ilə ardıcıllıqdan asılı olmayan qarşılıqlı təsir yolu ilə birləşir. σ-faktor həmçinin transkripsiyanın start mərkəsində RNT polimerazaya ikiqat DNT zəncirini ayırmaqda kömək edir və kodlaşdırıcı zəmciri polimerazanın fəal saytına salır, transkripsiya +1 saytdan başlayır (bac Şəkil 5-11 pillə **2**). Optimal σ^{70}-RNT polimeraza promotr ardıcıllığı çoxsaylı güclü promotorlar üçün aşağıda göstərilən "konsensus ardıcıllıq" kimi təyin olunmuşdur:

-35 rayon -10 ardıcıllıq

TTG**ACA**T — 15-17 əc — TAT**AA**T

Bu konsensus ardıcıllıq –35 və –10 rayonlarında mövqelərin hər birində daha çox rast gəlinən əsaslara malikdir. Hərflərin ölçüsü bu mövqelərin hər birində əsasları mutasiya etməklə bu əsasların təyin edilmiş əhəmiyyətini bildirir. Arıcıllıq, RNT sintez olunarkən eyni 5′→3′ istiqamətində olan DNT zəncirini (yəni, qeyri templeyt zənciri) göstərir. Amma, σ^{70}–RNT polimeraza ilkin olaraq ikizəncirli DNT-yə birləşir. Polimeraza bir neçə on nukleotid cütünü transkripsiya etdikdən sonra σ^{70} buraxılır. Beləliklə σ^{70}, transkripsiyanın inisiasiyası üçün tələb olunan, amma inisiasiya başa çatdıqdan sonra RNT zəncirinin elonqasiyası üçün tələb olunmayan *inisiasiya faktoru* rolunu oynayır.

lac Operonun Transkripsiyası Repressiya Oluna və Fəallaşa Bilir

E. coli laktoza olmayan mühitdə bitərkən lac mRNT-nin sintezi repressiya olunur, bununla da hüceyrə tələb olunmayan fermentin sintezi üçün hüceyrə enerjisini tullanti kimi sərf etmir. E. coli hüceyrələri, qlükoza və laktoza olan mühitdə, karbohidrat metabolizminin mərkəzi molekulu olan qlükozanı maddələr mübadiləsində daha üstünlüklə istifadə edir. Laktoza maddələr mübadiləsində o zaman yüksək dərəcədə istifadə olunur ki, qlükoza mühitdə tam tükənir və mühitdə laktoza mövcud olur. Onlar belə metabolik tənzimləməyə lac operonun transkripsiyasının repressiyası ilə nail olurlar, bu o vaxta qədər davam edir ki, laktoza mühitdə mövcud olur və sitozolda qlükozanın miqdarı aşağı səviyyəyə enənə qədər lac mRNT-nin yalnız aşağı səviyyədə sintezinə imkan verir. lac operonun müxtəlif şəraitlər altında transkripsiyasına lac repressor və katabolit aktivator zülalla (CAP, həmçinin cAMP reseptor zülal üçün katabolit reseptor zülal – CRP – kimi adlanır) nəzarət olunur, bunların hər biri, uyğun olaraq operator və CAP sayt adlanana lac transkripsiya nəzarət rayonunda spesifik DNT ardıcıllığına birləşir (Şəkil 9-4 yuxarıda).

lac operonun transkripsiyasının başlanması üçün, RNT polimerazanın σ^{70} subvahidi promotorun –35 və –10 ardıcıllıqlarında *lac* promotora birləşməlidir. Laktoza mövcud olmadıqda, *lac* repressor transkripsiyanın start saytı ilə üst-üstə düşən *lac* operatora birləşir. Ona görə də, operator saytına birləşmiş lac repressor σ^{70}-in birləşməsini blok edir və beləliklə, RNT polimeraza ilə transkripsiyanın inisiasiyasına mane olur (Şəkil 9-4a). Laktoza mövcud olanda, o tetramer *lac* repressorun hər bir subvahidində spesifik birləşmə saytına birləşir və zülalın konformasiya dəyişilməsinə səbəb olaraq onu *lac* operatordan dissosasiya etməyə vadar edir. Nəticədə, polimeraza promotora birləşə və *lac* operonun transkripsiyasını başlaya bilir. Amma, mühitdə qlükoza olanda transkripsiyanın inisiasiyasının sürəti çox aşağı olur və nəticədə yalnız az miqdarda *lac* mRNT və *lac* operonun kodlaşdırdığı zülallar sintez olunur (Şəkil 9-4b). Transkripsiyanın başlanması tezliyi ona görə aşağı olur ki, *lac* promotorda –35 və –10 ardıcıllıqlar əvəllər göstərilmiş ideal σ^{70}-birləşmə ardıcıllığından fərqlənir.

Qlükoza mühitdən tükəndikdə və hüceyrədaxili qlükozanın qatılığı endikdə, *E. coli* hüceyrələri buna tsiklik AMP-nin (cAMP) sintezi ilə cavab verir. cAMP-nin qatılığı artdıqda o, dimer CAP zülalın hər iki subvahidinin saytına birləşərək onda konformasiya dəyişikliyini əmələ gətirir, bu da zülalın, *lac* transkripsiya-nəzarət rayonunda olan CAP sayta birləşməsinə imkan verir. Birləşmiş CAP-cAMP kompleks promotora birləşmiş polimeraza ilə qarşılıqlı təsirə girir və transkripsiyanın inisiasiyası prosesini güclü şəkildə artırır. Belə fəallaşma yüksək səviyyədə *lac* mRNT-nin sintezinə və uyğun olaraq *lac* operon tərəfindən kodlaşdırılan zülalların sintezinə aparır (Şəkil 9-4c).

Faktiki olaraq, *lac* operon, Şəkil 9-4a-c hissələrində təsvir olunan sadələşdirilmiş modeldən daha mürəkkəbdir. Tetramer *lac* repressor eyni vaxtda iki sayta birləşir, bunlardan biri (*lacO*1) əsas operatorda olan promotor zonasında RNT polimerazanın birləşdiyi DNT rayonu ilə üst-üstə düşür, digəri isə mərkəzi +412-də (*lacO*2) və -82-də (*lacO*3) yerləşən iki ikinci dərəcəli operatorlardan biridir (Şəkil 9-4d). *lac* repressor dimerlərin dimeri olan tetramerdir. Hər dimer bir operatora birləşir. Tetramer *lac* repressorun əsas *lac* operator *O*1 və iki ikinci dərəcəli operatorlardan biri ilə eyni vaxtda birləşməsi ona görə mümkündür ki, DNT bizim eukariotik nukleosomlarda histon zülalların yaratdığı oktamerinlərin səthində DNT-nin büküldüyü zaman gördüyümüz kimi, kifayət qədər çox dəyişkəndir (flexible) (bax Şəkil 8-24). İkinci dərəcəli operatorlar, repressorun birləşməsi ilə RNT polimerazanın birləşməsinə mane olan əsas operatorun mikro-yaxınlığında *lac* repressorun lokal qatılığının artırılması üçün fəaliyyət göstərir. Birləşmə reaksiyalarının tarazlığı birləşən iştirakçıların qatılığından asılı olduğundan, *O*1 yaxınlığında *lac* repressorun əmələ gəlmiş lokal yüksək qatılığı repressorun *O*1-ə birləşməsini artırır. Hər bir *E. coli* hüceyrəsində təxminən 10 *lac* repressor tetramer olur. *O*2 və *O*3-ə birləşdiyinə görə, demək olar ki, həmişə *lac* repressor tetramer *O*1-ə onun başqa halda, 10 repressorun hüceyrə boyunca təsadüfi diffuziyasında ola biləcəyindən daha yaxın olur. Əgər həm *O*2 həm də *O*3 mutasiya olunarsa və *lac* repressor onlara yüksək afinliklə birləşə bilmirsə, *lac* promotorun repressiyası 70 dəfə azalacaq. Yalnız *O*2-nin və ya *O*3-ün mutasiyası repressiyanı iki dəfə azaldır, bu da göstərir ki, bu ikinci dərəcəli operatorların istənilən biri repressorun stimullaşmasını təmin edir.

E. coli hüceyrəsinin müxtılif genlərinin promotorları kifayət qədər homologiya nümayiş etdirsələr də, onların dəqiq arıcıllığı fərqlənir. Repressor və ya aktivator zülalları olmadıqda, genin transkripsiyasını RNT polimeraza-σ komplekslərinin inisiasiya edildiyi daxili sürəti promotor ardıcıllığı təyin edir. Transkripsiyanın yüksək sürətli inisiasiyasına kömək edən promotorlar əvvəllər göstərilmiş ideal promotora oxşar olan –10 və –35 ardıcıllıqlara malikdirlər və

güclü promotorlar adlanırlar. Aşağı sürətli transkripsiya inisiasiyasını təşviq edən promotorlar bu ideal ardıcıllıqdan fərqlənirlər və *zəif promotorlar* adlanırlar. Məsələn, *lac* operon zəif promotordur, onun ardıcıllığı bir neçə mövqedə güclü promotorun konsensus ardıcıllığından fərqlənir. Onun bu cürə aşağı daxili inisiasiya tezliyi *lac* repressorla daha da zəifləyirr, cAMP-CAP komplekslə isə, əhəmiyyətli dərəcədə artırılır.

Kiçik Molekullar Çox Bakteriya Genlərinin Ekspressiyasını DNT-Birləşdirən Aktivatorlarla və Repressorlarla Tənzimləyir

E. coli genlərinin əksəriyyəti *lac* operonda təsvir olunmuş proseslərə oxşar proseslə tənzimlənir, hərçənd ki, hər bir promotor üçün qarşılıqlı təsirlərin detalları fərqlənir. Əsas mexanizmə, genin və ya operonun operator rayonuna birləşən, beləliklə də transkripsiyanın inisiasiyasına mane olan spesifik repressor daxildir. Kiçik molekullu liqand repressora birləşir, onun DNT-birləşdirmə fəallığına nəzarət edir, nəticədə transkripsiyanın sürətini hüceyrənin ehtiyacına müvafiq olaraq nizamlayır. *lac* operonda olduğu kimi, çox saylı eubakterial transkripsiya-nəzarət rayonları, repressiyaya kömək edən bir və ya daha artıq ikinci dərəcəli operatorlara malik olurlar.

lac operonda CAP kimi spesifik aktivator zülallar da həmçinin, aktivator üçün birləşmə saytına malik olan bir çox bakterial genlərin transkripsiyasına nəzarət edir. CAP kimi başqa aktivatorlar da RNT polimeraza ilə birlikdə DNT-yə birləşirlər və transkripsiyanı xüsusi promotordan stimullaşdırırlar. Aktivatorun DNT-birləşdirmək fəallığı hüceyrənin ehtiyacına uyğun olaraq kiçik-molekullu liqandlarla (məsələn cAMP) birləşməklə və ya post-translyasiya modifikasiyası ilə, məsələn aktivatorun konformasiyasını dəyişən fosforlaşma ilə modifikasiya oluna bilər.

Transkripsiyanın Bəzi Promotorlardan İnisiasiyası Alternativ Siqma Faktorlarını Tələb Edir

E. coli promotorlarinin çoxu, bakterial fermentin əsas inisiasiya forması σ^{70}-RNT polimeraza ilə qarşılıqlı əlaqə yaradır. Amma, müəyyən qrup genlərin transkripsiyası, σ^{70}-dən fərqli olaraq müxtəlif konsensus promotor ardıcıllığını tanıyan bir neçə alternativ siqma faktorlarından birinə malik olan *E. coli* mRNT polimerazalarla inisiasiya olunur (Cədvəl 9-1). Bu alternativ σ-faktorlar, oxşar funksiyaya malik olan genlər dəstinin, məsələn istilik şokuna olan cavab reaksiyasına, azot çatışmazlığına, hərəkətliliyə və ya qram müsbətlərdə sporlamaya cavab reaksiyasına daxil olan genlərin transkripsiyası üçün tələb olunur. *E. coli*-də "evdarlıq" σ-faktoru olan σ^{70}-dən əlavə altı siqma faktor vardır. Qram-müsbət sporlayan bakteriya *Streptomyces coelicolor*-in genomu 63 σ-faktoru kodlaşdırır, hal-hazırda bu yüzlərlə eubakterial genomun ardıcıllıq analizlərinə əsaslanan cari rekorddur. Bunlardan çoxu quruluşuna və funksiyasına görə σ^{70}-ə yaxındır. σ^{70}-ə oxşar faktora malik olan RNT polimeraza ilə transkripsiyanın inisiasiyası, polmerazanın birləşdiyi rayona yaxın rayonda DNT-yə birləşən repressorlarla və aktivatorlarla tənzimlənir. Amma *E. coli*-də σ^{54} ilə təmsil olunan bir sinif σ^{70}-ə yaxın deyil və fərqli fəaliyyət göstərir.

CƏDVƏL 9-1 *E. coli*-nin Siqma Faktorları

Siqma faktor	Tanınan promotorlar	Promotor konsensus	
		–35 rayonu	**–10 rayonu**
σ^{70} (σ^{D})	Evdarlıq genləri, eksponensial bölünən hüceyrələrdə genlərin çoxu	TTGACA	TATAAT
σ^{S} (σ^{38})	Stasionar faza genləri və ümumi stresə cavab	TTGACA	TATAAT
σ^{32} (σ^{H})	Sitoplazmada bükülməmiş zülallarla induksiya olunur; bükülməmiş zülalları yenidən bükən çaperonları və sitoplazmada bükülməmiş zülalların parçalanmasını aparan proteaza sistemlərini kodlaşdıran genlər	TCTCNCCCTTGAA	CCCCATNTA
σ^{E} (σ^{24})	Periplazma boşluğunda və hüceyrə membranında bükülməmiş zülallarla fəallaşan; hüceyrə qabığının bütövlüyünü bərpa edən zülalları kodlaşdıran genlər	GAACTT	TCTGA
σ^{F} (σ^{28})	Qamçının toplanmasında iştirak edən genlər	CTAAA	CCGATAT
FecI (σ^{18})	Dəmirin sorulmsında iştirak edən genlər	TTGGAAA	GTAATG
		-24 Rayonu	**-12 Rayonu**
σ^{54} (σ^{N})	Azot metabolizmi və başqa funksiayların genləri	CTGGNA	TTGCA

Verilənlər: T.M. Geuber and C.A. Gross, 2003, *Ann. Rev. Microbiol*. **57**:441, və B.K. Cho et al., 2014, *BMC Biol*. **12**:4.

σ^{54}-RNT Polimeraza ilə Transkripsiyaya Promotordan Çox Uzaqda Birləşmiş Aktivatorlarla Nəzarət Olunur

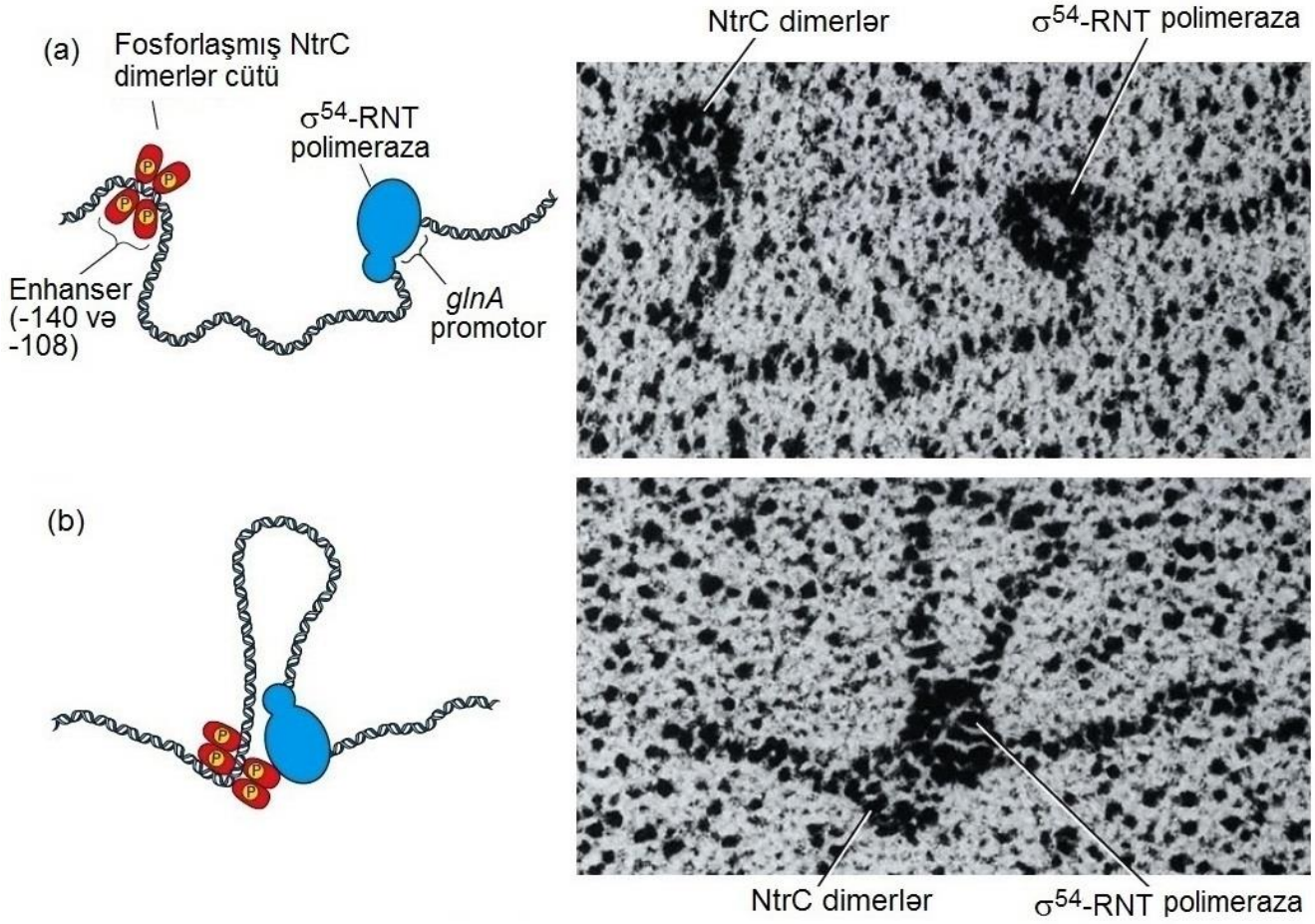
σ^{54}-ün ardıcıllığı bütün σ^{70}-ə bənzər faktorlarınkından fərqlənir. Genlərin σ^{54}-ə malik olan RNT polimeraza ilə transkripsiyası yalnız, DNT-də **enhanserlər** adlandırılan, start saytından 90-160 əsas cütü yuxarıda yerləşən birləşmə saytına malik olan aktivatorla tənzimlənir. Hətta, enhanserlər start saytından kilo

əsas ölçüdə kənara uzaqlaşsa belə σ^{54}-aktivatorlar transkripsiyanı fəallaşdıra bilirlər.

Çox yaxşı xarakterizə olunmuş σ^{54}-aktivator – NtrC zülal (Nitrogen requlatori protein C – azot tənzimləyici zülal C) *gln*A genin transkripsiyasını stimullaşdırır. *gln*A, qlutamin turşusundan və amonyakdan qlutamin amin turşusunu sintez edən qlutamin sintetaza fermentini kodlaşdırır. σ^{54}-RNT polimeraza *gln*A promotora birləşir, amma DNT zəncirlərini ayırmır və dimer zülal NtrC ilə fəallaşmayınca transkripsiyanı başlamır. NtrC, öz növbəsində NtrB adlanan proteinkinaza ilə tənzimlənir. Qlutaminin aşağı səviyyədə olmasına cavab olaraq, NtrB dimer NtrC-ni fosforlaşdırır, o da öz növbəsində glnA promotordan yuxarı istiqamətdə enhanserə birləşir. Enhanserlə-birləşmiş fosforlaşmış NtrC sonra ikiqat DNT zəncirlərini ayırmaq və transkripsiyanı başlamaq üçün promotora birləşmiş σ^{54}-polimerazanı stimullaşdırır.

Elektron mikroskopiya tədqiqatları göstərdi ki, enhanserə birləşən fosforlaşmış NtrC və promotora birləşən σ^{54}-polimeraza birbaşa qarşılıqlı əlaqədə olurlar və birləşmə saytları arasında DNT-də ilgək əmələ gətirirlər (Şəkil 9-5). Sonra bu fəsildə müzakirə olunduğu kimi, bu fəallaşma mexanizmi transkripsiyanın eukariotlardakı daha geniş yayılmış fəallaşma mexanizmini xatırladır.

NtrC-nin ATP-aza fəallığı vardır və birləşmiş σ^{54}-polimerazanın fosforlaşmış NtrC ilə fəallaşması üçün ATP hidrolizi tələb olunur. ATP hidrolizində qüsurlu olan NtrC mutantlarda, transkripsiyanın start saytında DNT zəncirlərinin ayrılması üçün σ^{54}-polimerazanın stimullaşdırılması geriyə dönməz qüsurlu olur. Belə fərz olunur ki, ATP hidrolizi DNT zəncirlərinin əriməsi üçün tələb olunan enerjini təmin edir. Əksinə, σ^{70}-polimeraza start saytında zəncirləri ayırmaq üçün ATP hidrolizini tələb etmir.

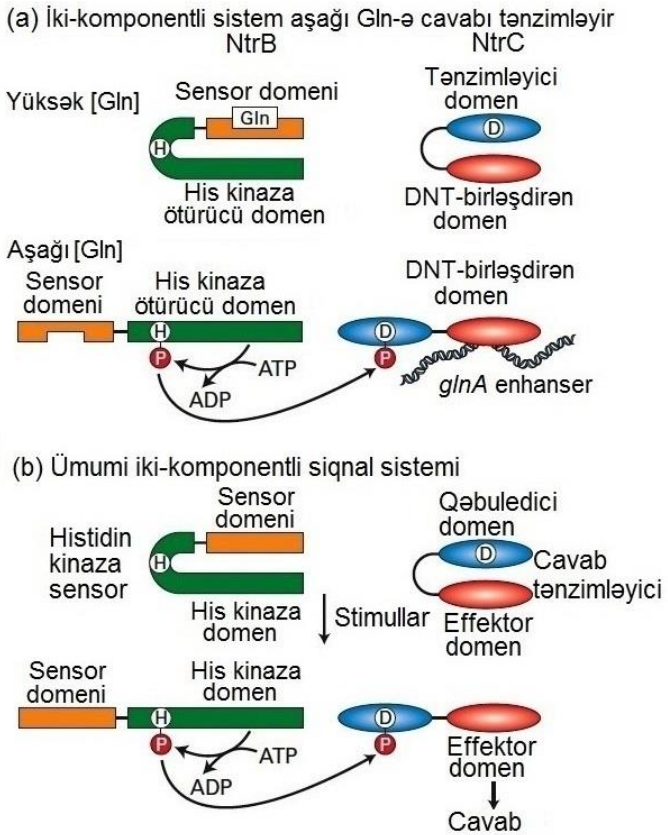


EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 9-5 DNT ilgəkləri birləşmiş NtrC və σ^{54}-RNT polimeraza qarşılıqlı əlaqəsinə imkan yaradır. (a) Bir ucu yaxınlığında enhanser rayonuna birləşmiş fosforlaşmış NtrC dimerlər, başqa bir ucu yaxınlığında isə *gln*A promotora birləşmiş DNT restriksiya fraqmentinin σ^{54}-RNT polimeraza ilə birlikdə əl ilə çəkilmiş (*solda*) və elektron mikrofotosu (*sağda*). (b) Eyni fraqmentin preparatlarının əl ilə çəkilmiş (*solda*) və elektron mikrofotosu (*sağda*) NtrC dimerlərin və σ^{54}-RNT polimerazanın bir-birinə birləşməsini və onlar arasındakı DNT-nin ilgək əmələ gətirməsini göstərir. Bax W. Su et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **87**:5504. [Mikrofotolar nəzakətlə Harrison Echols və Carol Gross tərəfindən vermişdir.]

Çox Bakterial Cavab Reaksiyaları İki-Komponentli Tənzimləyici Sistemlərlə Nəzarət Olunur

Bizim indi gördüyümüz kimi, *E. coli*-də *gln*A geninin nəzarət olunması iki zülaldan, NtrC və NtrB-dən asılıdır. Bu cürə ikikomponentli

tənzimləyici sistemlər bakteriyalarda onları əhatə edən mühitdəki dəyişikliyə qarşı çoxsaylı cavab reaksiyalarına nəzarət edir. Qlutaminin yüksək qatılığında, qlutamin NtrB-nin sensor domeninə birləşir, onun histidinkinaza fəallığını ingibirləşdirən konformasiya dəyişikliyinə səbəb olur (Şəkil 9-6a). Eyni zamanda, NtrC-nin tənzimləyici domeni *gln*A enhanserin DNT-birləşdirən domenə birləşməsini blok edir. Qlutaminin aşağı qatılığında, qlutamin NtrB zülalın sensor domenindən dissosasiya edir, NtrB-də ATP-nin γ-fosfatını ötürücü (transmitter) domenindəki histidin (H) qalığına keçirən histidinkinazanın *ötürücü* (*transmitter*) domeninin fəallaşmasına səbəb olur. Bu fosfohistidin, sonra fosfatı NtrC zülalda olan asparagin turşusuna (D) ötürür. Bu NtrC-də konformasiya dəyişikliyinə və nəticədə NtrC-də DNT-birləşdirən domenin açılmasına (unmask) səbəb olur, nəticədə o *gln*A enhanserlə birləşə bilir.



ŞƏKİL 9-6 İki-komponentli tənzimləyici sistemlər. Sitoplazmada qlutaminin aşağı qatılığında, qlutamin NtrB-dən dissosasiya olunur, nəticədə ATP-nin qamma-fosfatını ötürücü domendəki konservativ histidin (H) qalığına keçirən, proteinkinazanın ötürücü domenini fəallaşdıran konformasiya dəyişikliyi baş verrir. Sonra bu fosfat cavab reaksiyasını tənzimləyən NtrC-nin tənzimləyici domenindəki asparagin turşusuna (D) ötürülür. Bu NtrC-ni qeyri fəal formadan fəal formaya keçirir və *gln*A promotordan yuxarıya doğru enhanserə birləşir (bax Şəkil 9-5). (b) Bakteriyalarda və bitkilərdə iki-komponentli histidil-asparatil fosfo-rele (fosfor-ötürən) tənzimləyici sistemlər. Bax A.H. West and A.M. Stock, 2001, *Trends Biochem. Sci*. **26**:369.

Başqa çoxsaylı bakterial cavab reaksiyaları, NtrB və NtrC-yə homoloji olan iki zülalla tənzimlənirlər (Şəkil 9-6b). Bu tənzimləyici sistemlərin hər birində *histidin kinaza sensoru* adlanan bir zülal latent (gizli) histidin kinaza ötürücü domeninə malikdir, bu da sensor domen tərəfindən aşkar olunan ətraf mühit dəyişilməsinə cavab olaraq tənzimlənir. Fəallaşan zaman ötürücü domen ATP-nin γ-fosfatını ötürücü domendəki histidin qalığına keçirir. *Cavab tənzimləyicisi* kimi adlanan ikinci zülal, NtrC zülalın fəallaşmış NtrB ilə fosforlaşan asparagin turşusu qalığı olan rayonuna homoloji olan *qəbuledici* (*receiver*) domenə malikdir. Cavab tənzimləyicisi ikinci funksional domenə malikdir, bu domen qəbuledici domenin fosforlaşması ilə tənzimlənir. Çox hallarda cavab tənzimləyicisinin bu domeni ardıcıllıq-spesifik DNT-birləşdirən domendir, uyğun DNT ardıcıllığına birləşir, ya *lac* repressora oxşar olaraq repressor kimi, ya da CAP və NtrC-ə bənzər aktivator kimi fəaliyyət göstərərək spesifik genin transkripsiyasını tənzimləyir. Amma, effektor domen, qida maddələrinin qatılıq qradientinə cavab oalaraq bakteriyanın üzdüyü istiqamətə nəzarət etmək kimi başqa funksiyalara da malik ola bilir. Baxmayaraq ki, bütün ötürücü domenlər homolojidirlər (qəbuledici domenlərdə olduğu kimi), spesifik sensor zülalların ötürücü domeni yalnız spesifik cavab tənzimləyicilərinin qəbuledici domeninlərini fosforlaşdıracaq və ətraf mühitin müxtəlif dəyişmələrinə qarşı spesifik cavablara imkan yaradacaq. Oxşar iki-komponentli histidil-asparatil fosfor-ötürən (fosfo-rele) tənzimləyici sistemlər bitkilərdə də tapılmışdır.

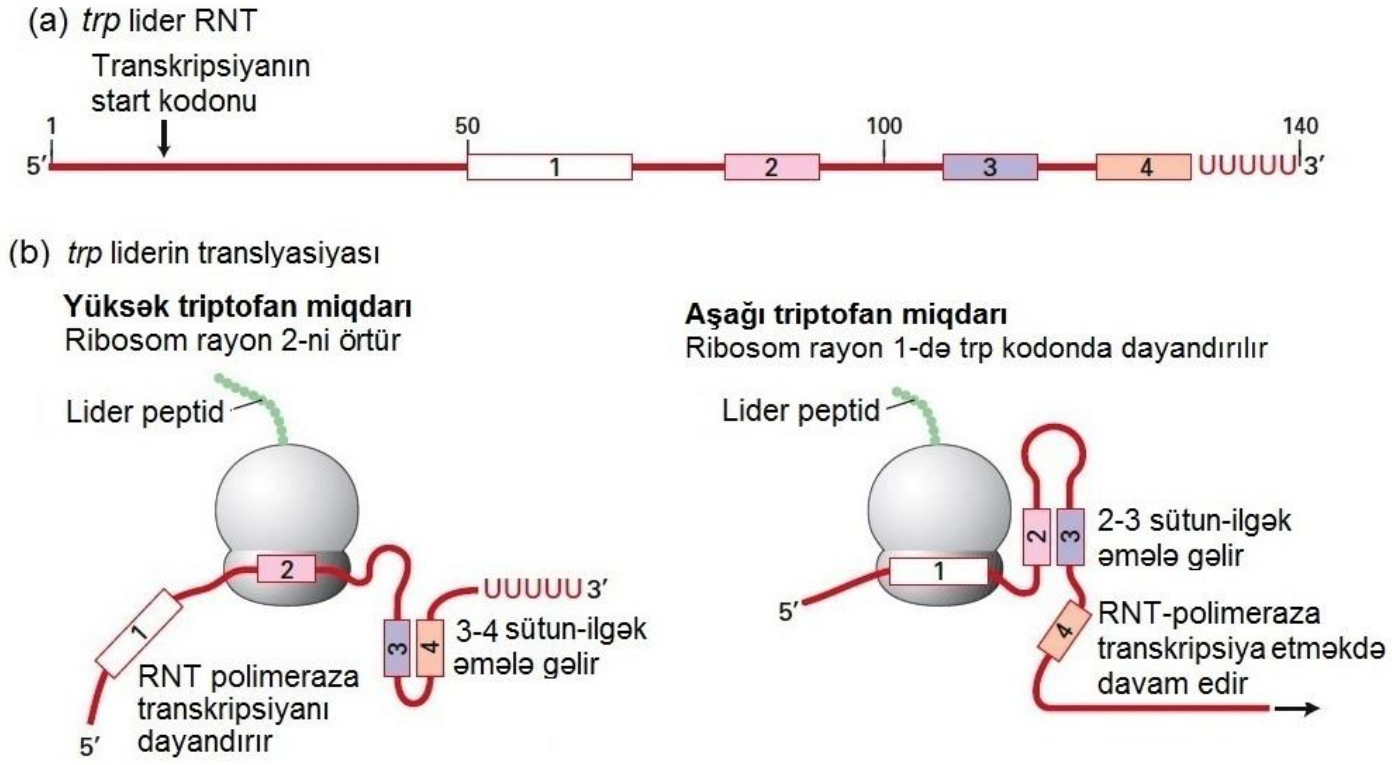
Çox Bakterial Operonların Ekspressiyası Transkripsiyanın Elonqasiyasının Tənzimlənməsi ilə Nəzarət olunur

Transkripsiyanın inisasiyasının aktivatorlar və repressorlarla tənzimlənməsindən başqa, çox bakterial operonların ekspressiyasına transkripsiyanın promotora-yaxın rayonunda elonqasiyanın tənzimlənməsi yolu ilə də nəzarət olunur. Nəzarətin bu mexanizmi ilk dəfə, *E. coli*-də *Trip* operonun transkripsiyasının öyrənilməsi zamanı aşkar olunmuşdur (ba Şəkil 5-13). Sitoplazmada triptofanın qatılığı yuxarı olanda *trip* operonun transkripsiyası *trip* repressorla repressiya olunur. Amma, transkripsiyanın hələ də aşağı səviyyədə baş verən insiasiyasına, zülalların yüksək dərəcədə sintezini təmin etmək üçün yüklənmiş $tRNT^{Trp}$ qatılığı kifayət qədər olduğu zaman, *attenuasiya* (*attenuation – zəifləmə, azalma*) adlanan proseslə nəzarət olunur. *trp* operonun birinci 140 nukleotidi triptofanın biosintezi üçün tələb olunan zülalları kodlaşdırmır, əksinə, Şəkil 9-7a-dakı diaqramda göstərildiyi kimi qısa peptid "aparıcı ardıcıllığı" təşkil edir. Bu aparıcı ardıcıllıqda rayon 1 iki ardıcıl Trp kodona malikdir. Rayon 3 rayon 2 və ya rayon 4-lə əsas cütü əmələ gətirə bilir. Ribosom RNT polimerazanın ardınca ona çox yaxın davam edərək, *trp* aparıcı (lider) ardıcıllığın 5′ sonluğu RNT polimerazadan çıxdıqdan dərhal sonra aparıcı peptidin translyasiyanı, inisiasiya edir. Yüksək dərəcədə zülal sintezini təmin etmək üçün $tRNT^{Trp}$ qatılığı kifayət qədər olduğu zaman ribosom rayon 1-dən rayon 2-ə doğru translyasiya edir, rayon 2-nin transkripsiya edən RNT polimerazanın səthindən yenicə ayrılmş rayon 3 ilə əsas cütü əmələ gətirməsinə mane olur (Şəkil 9-bb, *solda*). Əvəzində, rayon 3 rRNT polimerazanın səthindən yenicə çıxan rayon 4-lə əsas cütü əmələ gətirir və RNT sancağını

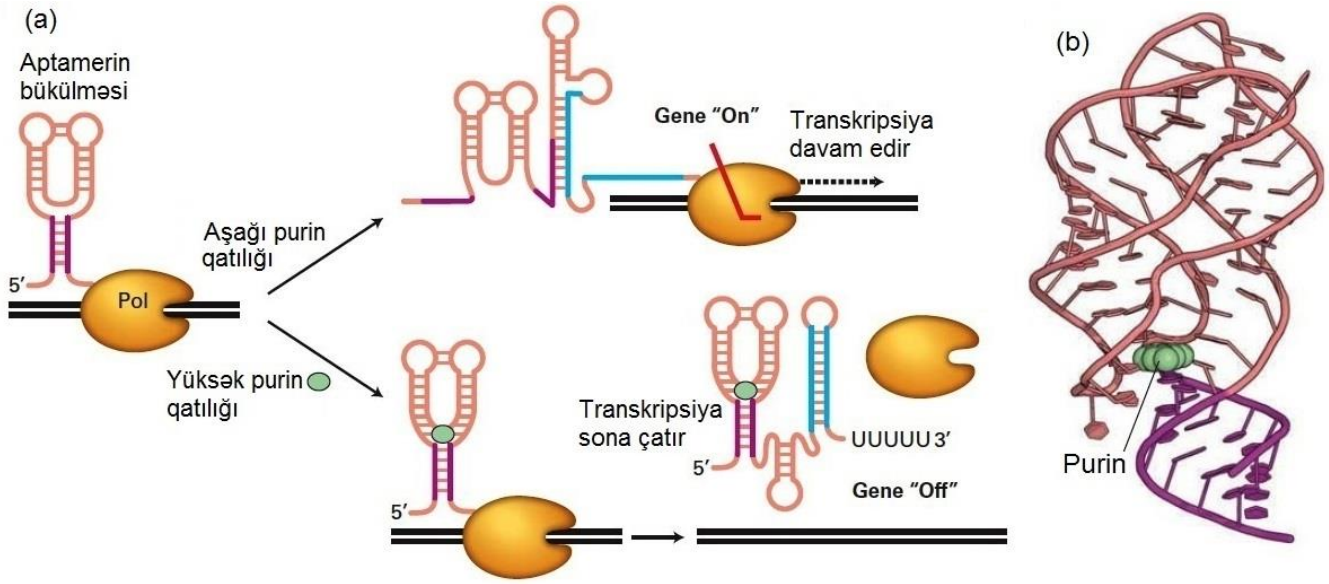
formalaşdırır (bax Şəkil 5-9a), bunun ardınca bir neçə urasil gəlir, bu da RNT polimerazaya transkripsiyaya aram verməк və onu dayandırmaq siqnalı verir. Nəticədə, triptofanın qatılığı yüksək olduğu halda uzun *trp* operonun qalan hissəsi transkripsiya olunmur və hüceyrə onun sintezi üçün və ya onun kodlaşdırdığı zülalın sintezi üçün tələb olunan enerjini lazımsız yerə sərf etmir.

Amma, $tRNT^{Trp}$ qatılığı yüksək dərəcədə zülal sintezini təmin etmək üçün kifayət qədər olmadıqda, ribosom rayon 1-də iki ardıcıl Trp kodonda dayanır (Şəkil 9-7b, *sağda*). Bunun nəticəsində, rayon 3 transkripsiya edən RNT polimerazadan çıxan kimi rayon 2 onunla əsas cütü əmələ gətirir. Bu rayon 3-ün rayon 4-lə əsas cütü əmələ gətirməsinə mane olur, beləliklə də 3-4 sancaq formalaşmır və nəticədə RNT polimerazanın aram verməsinə (dayanmasına) və ya transkripsiyanın terminasiyasına səbəb olumur. Nəticədə, triptofanın sintezi üçün tələb olunan zülallar, uzun polisistron *trp* mRNTdə bu zülalların hər biri üçün start kodonlarında translyasiyanı inisiasiya edən ribosomlarla translyasiya olunur.

Transkripsiyanın elonqasiyasının attenyuasuyası bəzi operonlarda və başqa amin turşularının və metabolitlərin sintezində iştirak edən fermentləri kodlaşdıran tək genlərdə də *ribokeçiricilərin* (*riboswitches*) fəaliyyəti nəticəsində baş verir. Ribokeçiricilər RNT ardıcıllığı olub bakterial mRNT-lərin əksəriyyətində 5′ translyasiya olunmayan rayonda tapılmışdır. Onlar aptamerlər adlanan mürəkkəb üçüncü quruluşda bükülürlər, kiçik molekullu metabolitlər kifayət qədər yüksək qatılıqlarda mövcud olarkən onlarla birləşən kompleksi əmələ gətirirlər. Bəzi hallarda bu birləşmə sütun-ilgək quruluşun yaranması ilə nəticələnir və purin sintezində iştirak edən fermentləri kodlaşdıran *Bacillus subtilis xpt-pbuX* operonunda olduğu kimi, transkripsiyanın erkən terminasiyasına səbəb olur (Şəkil 9-8). Bu kiçik-molekullu metabolitlərin qatılığı aşağı olanda, metabolitlər aptamerlər ilə birləşmirlər və transkripsiyanın terminasiyasını induksiya etməyən alternativ RNT quruluşu formalaşır və metabolitlərin sintezində iştirak edən fermentləri kodlaşdıran genlərin transkripsiyasına imkan verir. Aşağıda bizim görəcəyimiz kimi, transkripsiyanın terminasiyası mexanizmi eukariotlarda fərqli olsa da, son zamanlar aşkar olunmuşdur ki, çoxhüceyrəli orqanizmlərdə də genlərin ekspressiyasının tənzimlənməsində transkripsiyanın promotora-yaxın rayonda aram verməsi və terminasiyasının tənzimlənməsi tez-tez baş verrir



ŞƏKİL 9-7 *E. Coli trip* operonunda RNT polimerazanın elonqasiyanın və terminasiyasının tənzimlənməsi ilə transkripsiyanın nəzarət olunması. (a) 140 nukleotid *trp* aparıcı (lider) RNT-nin diaqramı. Rənglənmiş rayonlar atenyuasiya üçün kritik əhəmiyyətlidir. (b) *trp* aparıcı ardıcıllığın translyasiyası onun 5′ sonluğundan o transkripsiya olunduqdan dərhal sonra başlayır, bu zaman polisistron *trp*-mRNT molekulunun qalan hissələrinin transkripsiyası hələ də davam edir. Yüklənmiş $tRNT^{Trp}$-nin yüksək qatılığında, 3-4 sütun-ilgək quruluşun formalaşmasının ardınca gələn bir sıra urasillər transkripsiyanın terminasiyasına səbəb olur. Yüklənmiş $tRNT^{Trp}$-nin aşağı qatılığında, 3 rayonu 2-3-sütun ilgək kimi ayrılır və rayon 4-lə əsas cütü əmələ gətirə bilmir. Terminasiya üçün tələb olunan ilgək-sütun quruluş olmadığından *trp* operonun transkripsiyası davam edir. Bax C. Yanofsky, 1981, *Nature* **289**:751.



ŞƏKİL 9-8 *B. subtilis*-də transkripsiyanın terminasiyasına ribokeçirici ilə nəzarət. (a) Purinin sintezində iştirak edən fermentlərin daxil olduğu *Bacillus subtilis xpt-pbuX* operonun transkripsiyası zamanı mRNT-nin 5′ sonluğu sitoplazmada purinlərin qatılığından asılı olaraq alternativ quruluşda bükülə bilir və "purin ribokeçiricini" əmələ gətirir. Purinlərin yüksək qatılığında ribokeçirici purin liqanda birləşən aptamerdə bükülür (abı dairələr), *E. coli* trip operonda triptofanın yüksək qatılığında mRNT-nin əmələ gətirdiyi (bax Şəkil 9-7), yəni sütun-ilgəkdən sonra U-ların gəldiyi terminasiya siqnalına oxşar olan, transkripsiyanın sütun-ilgək terminasiya siqnalının yaranmasına imkan verir. Aşağı purin qatılığında transkripsiyanın terminasiyası siqnalının yaranmasına mane olan və operonun transkripsiyasına imkan yaradan alternativ RNT quruluşu yaranır. Qeyd edək ki, RNT-nin qırmızı və mavi rayonları alternativ əsas cütü əmələ gətirir. (b) Purinə (abı rəng) birləşmiş purin ribokeçiricinin rentgen kristalloqrafiyaya əsaslanan quruluşu. Bax A.D. Garst, A. L. Edwards, and R. T. Batey, 2011, *Cold SpringHarb. Perspect. Biol.* **3**:a003533. [(b)hissəsiR. T. Batey, S. D. Gilbert, andR. K. Montagne, 2004, *Nature* **432**:411, PDB ID 4fe5-dən.]

9.1 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Bakteriyalarda Genlərin Ekspressiyasına Nəzarət

- Həm prokariotlarda həm də eukariotlarda genlərin ekspressiyası əsasən transkripsiyanın inisiasiyasına nəzarət edən mexanizmlə tənzimlənir.
- *E. coli*-də transkripsiyanın inisiasiyasının birinci mərhələsi RNT polimeraza ilə birləşərək kompleks əmələ gətirən σ faktorun promotorla birləşməsidir.
- Promotorun nukleotid ardıcıllığı onun gücünü təyin edir, bu bir dəqiqə müddətində müxtəlif RNT polimerazaların hansı tezlikdə birləşərək transkripsiyanı inisiasiya etməsi deməkdir.
- Repressorlar promotorla üst-üstə düşən və ya ona çox yaxın yerləşən operator ardıcıllığına birləşən zülallardır. Repressorun operatora birləşməsi transkripsiyanın inisiasiyasını və ya elonqasiyasını ingibirləşdirir.
- Bakterial repressorların əksəriyyətinin DNT-birləşdirmə fəallığı kiçik molekullu liqandlarla modulyasiya olunur. Bu bakterial hüceyrələrə imkan verir ki, mühitdə müxtəlif qida maddələrinin qatılığında və sitoplazmada metabolitlərin qatılığında baş verən dəyişilmələrə cavab olaraq spesifik genin transkripsiyasını tənzimləsinlər.
- *lac* operin və bəzi başqa bakterial genlər də promotordan sonra birləşən və promotora birləşmiş RNT polimeraza ilə birbaşa əlaqəyə girməklə transkripsiyanın inisiasiyasının tezliyini artıran aktivator zülallarla tənzimlənir.
- *E. coli*-nin əsas siqma faktoru σ^{70}-dir, amma, hər biri fərqli konsensus promotor ardıcıllığını tanıyan və və ya fərqli aktivatorlarla qarşılıqlı əlaqədə olan bir sıra başqa, az yayılmış siqma fakorlar da tapılmışdır.
- σ^{54}-ə malik olanlar istisna olmaqla, bütün *E. coli* RNT polimerazalarla transkripsiyanın insiasiayası, transkripsiyanın start saytının yaxınlığına birləşən repressorlarla və aktivatorlarla tənzimlənə bilir (bax Şəkil 9-4)
- σ^{54}-RNT polimeraza ilə transkripsiya olunan genlər, transkripsiyanın start saytından təxminən 100 əsas cütü yuxarıda yerləşən enhanserlərə birləşən aktivartprlarla tənzimlənir. Aktivator və σ^{54}-RNT polimeraza qarşılıqlı təsirdə olarkən onların birləşmə saytları arasındakı DNT ilgək əmələ gətirir (bax Şəkil 9-5).
- İki-komponentli tənzimləyici sistemlərdə bir zülal, qida maddələrinin və ya ətraf mühitdəki başqa komponentlərin səviyyəsini göstərən (ekranlaşdıran) sensor kimi fəaliyyət göstəri. Müvafiq şərait altında, ATP-in γ-fosfatı əvvəlcə cavab tənzimləyicisi olan birinci sensor zülalda olan histidin qalığına keçirilir və sonra ikinci zülaldakı asparagin qalığına ötürülür. Fosforlaşmış cavab tənzimləyicisi sonra stimula cavab olaraq, DNT tənzimləyici ardıcıllığa birləşmək kimi spesifik funksiyanı həyata keçirir və bununla da spesifik genin transkripsiyasını stimullaşdırır və ya repressiya edir (bax Şəkil 9-6).
- Bakteriyalarda transkripsiya promotora yaxın zonada transkripsiyanın elonqasiyasına nəzarət etməklə də

tənzimlənə bilər. Bu nəzarət, bakterial RNT-polimerazanın transkripsiyaya aram verməsinə və transkripsiyanı dayandırmasına səbəb olan sütun-ilgəyin əmələ gəldiyini və ardınca urasil zəncirin meydana gəldiyini təyin etmək üçün, *E. Coli trp* operonunda olduğu kimi ribosomun yeni sintez olunan mRNT-yə birləşməsi ilə (bax Şəkil 9-7), və ya *B. Subtilis*-in *xpt-pbuX* operonunda olduğu kimi, kiçik molekulları birləşdirən RNT ardıcıllığı olan ribokeçiricilərlə (bax Şəkil 9-8) həyata keçirilə bilər,

9.2 Eukariotlarda Gen Nəzarətinə Ümumi Baxış

Bakteriyalarda gen nəzarəti əsasən tək bir hüceyrənin bölünməsini və inkişafını optimallaşdırmaq üçün onun ətrafındakı mühitin dəyişilmələrinə uyğunlaşmasına imkan verir. Çoxhüceyrəli orqanizmlərdə ətraf mühitdəki dəyişiklik gen ekspressiyasındakı dəyişikliyi də induksiya edir. Məsələn, aşağı oksigen qatılığına (hipoksiya) cavab reaksiyasında spesifik genlər dəsti tez bir şəkildə induksiya olunaraq hüceyrənin hipoksiya şəraitində sağ qalmasına kömək edir. Bu genlərə, yeni kapilyarların inkişaf edərək ətraf toxumalara nüfuz etməsini stimullaşdıran ifraz olunan anqiogen zülalları kodlaşdıran genlər daxildirlər. Amma, çoxhüceyrəli orqanizmlərdə genlərə nəzarətin daha xarakterik və bioloji cəhətdən daha uzaq məqsədi, əsasında embrioloji inkişaf duran genetik proqramın yerinə yetirilməsidir. Birlikdə çoxhüceyrəli orqanizmləri təşkil edən çoxsaylı müxtəlif hüceyrə tiplərinin yaradılması inkişaf dövründə düzgün genin düzgün hüceyrədə düzgün zamanda fəallaşmasından asılıdır.

Çox hallarda, hüceyrə inkişaf mərhələsinə keçdikdən sonra, o geriyə dönmür. Beləliklə, bu qərarlar ətraf mühitin dəyişmələrinə cavab olaraq bakteriyal genlərin geriyə dönən fəallaşmasından və ya repressiyasından köklü şəkildə fərqlənir. Öz genetik proqramını həyata keçirərkən, çoxsaylı differensasiya olunmuş hüceyrələr (məsələn, dəri hüceyrələri, qırmızı qan hüceyrələri, və anticismləri istehsal edən hüceyrələr) arxasında heç bir nəsil hüceyrəsini buraxmadan bu yolu son hüceyrə ölümünə qədər davam edirlər. Differensasiyaya aparan sabit gen nəzarəti nümunələri fərdi hüceyrələrin deyil bütöv orqanizmin sağ qalması və yaşamasına xidmət edir.

Bakteriyalarda və eukariotlarda gen nəzarətinin məqsədlərindəki fərqlərə baxmayaraq, ilk dəfə bakteriyalarda aşkar olunan və əvvəlki bölmədə müzakirə olunmuş transkripsiyanın nəzarətində olan iki əsas xüsusiyyət eukariot hüceyrələrə də tətbiq olunur. Birincisi, zülal-birləşdirən tənzimləyici DNT ardıcıllıqları və ya transkripsiya-nəzarət rayonları genlərlə assosasiyada olur. İkincisi, genlərdəki transkripsiya-nəzarət rayonlarına birləşən spesifik zülallar genlərdə transkripsiyanın harada başlayacağını və transkripsiyasının repressiya olunacağını yoxsa fəallaşdırılacağını təyin edir. Eukariotlarda və bakterialarda transkripsiyanın nəzarətinin fundamental fərqi eukariotik xromosomal DNT-nin histon oktamerlərlə assosasiyasının məntiqi nəticəsi olan nukleosomların formalaşması, müxtəlif dərəcədə kondensasiya olunmuş xromatini əmələ gətirən xromatin liflərdə yığılmasıdır (Şəkillər 8-24, 8-25, 8-27 və 8-28). Çoxhüceyrəli eukariotlarda çoxsaylı qeyri fəal genlər RNT polimerazaların və transkripsiyanın inisiasiyası üçün tələb olunan əsas transkripsiya faktorlarının birləşməsini ingibirləşdirən kondensasiya olunmuş xromatində toplanmışlar (bax Şəkil 9-3). Gendə transkripsiyanın start saytına yaxın rayonda və eləcə də kilo-əsaslarla uzaq məsafədə nəzarət elementlərinə birləşən fəallaşdırıcı zülallar (aktivator) xromatin dekondensasiyasını, RNT polimerazanın promotora birləşməsini və xromatin boyu transkripsiyanın elonqasiyasını təşviq edirlər. Aalternativ nəzarət elementlərinə birləşən repressor zülallar, xromatinin kondensasiya olunmasına səbəb olur, polimerazanın birləşməsini və transkripsiyanın elonqasiyasını ingibirləşdirir. Bu bölmədə, biz eukariotlarda genlərə nəzarətin əsas prinsiplərini müzakirə edəcəyik, bakterial və eukariot sistemlər arasında oxşar və fərqli cəhətləri göstərəcəyik. Bu fəslin sonrakı bölmələrində eukariotik transkripsiyanın spesifik aspektləri geniş detalları ilə təqdim ediləcək.

Eukariot DNT-lərin Tənzimləyici Elementləri Transkripsiyanın Start Saytına Yaxın və Çoxsaylı Kiloəsaslarla Kənarda Tapılmışdır

Müxtəlif hüceyrələrdə çoxsaylı genlərdə transkripsiyanın sürətinin ölçülməsi göstərdi ki, istər inisiasiya mərhələsində, istərsə də transkripsiyanın elonqasiyası zamanı promotora yaxın zonadan transkripsiyanın tənzimlənməsi, bakteriyalarda olduğu kimi, eukariotlarda da gen nəzarətinin çox geniş yayılmış formasıdır. Bakteriyalarda olduğu kimi, eukariotlarda da RNT polimerazanın harada birləşəcəyini və genin transkripsiyasının harada inisiasiya edəcəyini müəyyən edən DNT ardıcıllığı promotor adlanır. Xüsusi promotordan başlanan transkripsiya funksiyasına görə bakterial aktivatorlara və repressorlara ekvivalent olan DNT-birləşdirən zülallarla nəzarət olunur. Amma eukariot transkripsiya tənzimləyici zülalları başqa zülallarla assosasiyasından asılı olaraq, çox zaman ya transkripsiyanın fəallaşdırıcısı ya da onun ingibirləşdiricisi kimi fəaliyyət göstərir. Nəticədə onlara ümumilikdə transkripsiya faktorları deyilir.

Eukariot genomlarında transkripsiya faktorlarını birləşdirən DNT nəzarət elementləri prokariotik genomlarla müqayisədə onların tənzimlədikləri promotordan çox uzaqda yerləşir. Bəzi hallarda, ali eukariotlarda zülal kodlaşdıran genlərin ekspressiyasını tənzimləyən transkripsiya faktorları tənzimləyici sayta promotordan on minlərlə əsas cütü məsafədə yuxarıya (transkripsiyanın gedişinin əksi istiqamətiundə) və ya aşağıya (transkripsiyanın gedişi) istiqamətdə birləşirlər. Bu cürə düzülüşün nəticəsində, tək bir genin traskripsiyası çoxsaylı müxtəlif transkripsiya faktorlarının alternativ nəzarət elementlərinə birləşməsi ilə tənzimlənə bilər, bu zaman eyni genin birbaşa ekspressiyası müxtəlif hüceyrə tiplərində və inkişafın müxtəlif mərhələlərində istiqamətləndirilə bilər.

Məsələn, bir sıra ayrı-ayrı transkripsiya-nəzarət DNT rayonları məməlilərin *Pax*6 transkripsiya faktorunu kodlaşdıran genin ekspressiyasını tənzimləyir. Fəsil 1-də qeyd olunduğu kimi, Pax6 zülalı gözün inkişafı üçün tələb olunur. Pax6 zülalı həmçinin beyinin və onurğa beyinin bəzi rayonlarının inkişafı üçün və insulin kimi hormonları ifraz edən mədəaltı vəz hüceyrələrinin inkişafı üçün də tələb olunur. Fəsil 1-də qeyd olunduğu kimi, tək bir funksional *Pax*6 geninə malik olan

heteroziqot insan *antridia* xəstəliyi ilə, gözündə qüzeyli qişasının inkişaf etməməsi ilə doğulur (Şəkil 1-30d). Məməlilərdə *Pax*6 geni müxtəlif hüceyrə tiplərində və embriogenezin müxtəlif mərhələlərində fəaliyyət göstərən ən azı üç alternativ promotordan ekspressiya olunur (Şəkil 9-9a).

Tədqiqatçılar çox transkripsiya-nəzarət rayonlarını, tərkibində reportyor genin asanlıqla sınaq oluna bilən kodlaşdırıcı rayonu ilə yoxlamaq üçün DNT fraqmentlərinə malik olan rekombinant DNT molekullarını hazırlamaqla analiz edirlər. Tipik reportyor genlər arasında lüsiferazaını, böyük bir həssaslıqla analiz edilə bilən və lüminometerdən istifadə edərək yüksək intensivlikdə işığı əmələ gətirən fermenti kodlaşdıran geni göstərmək olar. Tez-tez istifadə olunan başqa reportyor genlər, flüoressent mikroskopu ilə vizuallaşdırıla bilən yaşıl flüoressent zülalı (GFP) (bax Şəkillər 4-9d və 4-16) və rəngsiz, həll ola bilən laktoza analoqu *X-gal* ilə inkubasiya olunduqda intensiv mavi, həll olmayan çöküntünü yaradan *E. coli β-qalaktozidaza*-nı kodlaşdırırlar. *Pax*6 0-eqzonundan yuxarıya istqamtd 8-kə DNT-yə qovşaq olunan β-qalaktozidaza reportyor genə malik olan transgen siçan hazırlanarkən (bax Şəkil 6-40) hamiləlik dövründə rüşeymin inkişafda olan göz linzasında, buynuzlu qişasında və mədəaltı vəzində β-qalaktozidaza müşahidə olundu (Şəkil 9-9b). Bu rayonun kiçik DNT fraqmentinə malik olan transgen siçanın analizi transkripsiyanın mədəaltı vəzidə, göz linzasında və buynuzlu qişada tənzimlənməsini həyata keçirən ayrı-ayrı transkripsiya-nəzarət rayonlarının xəritələşdirilməsinə imkan verdi. Başqa reportyor gen konstruktlarına malik olan transgen siçan əlavə transkripsiya-nəzarət rayonlarını da aşkar etdi (Şəkil 9-9a). Bu rayonlar inkişaf etməkdə olan torlu qişada (retinada) və inkişaf etməkdə olan beyinin digər rayonlarında (baş beyində) transkripsiyaya nəzarət edir. Bu transkripsiya-nəzarət rayonlarından bəziləri 4-cü və 5-ci eqzonlar arasındakı və 7-ci və 8-ci eqzonlar arasındakı intronlarda yerləşir. Məsələn, Şəkil 9-9a-da, 4 və 5-ci eqzonlar arasında nişanlanmış Retina rayonunun nəzarəti altında olan reportyor gen xüsusi olaraq retina reportyor geninin ekspressiyasına səbəb olmuşdur (Şəkil 9-9c).

Çox genlərin nəzarət rayonları genin kodlaşdırıcı eqzonlarından yüzlərlə kiloəsas uzaqda tapılmışdır. Bu cürə uzaq nəzarət elementlərinin təyin edilməsinin bir metodu uzaq qohum orqanizmlərin ardıcıllıqlarının müqayisəsidir. Konservativ genlər üçün transkripsiyanın-nəzarət rayonları da çox zaman konservativ olur və təkamül dövründə uzaqlaşmış qeyri-funksional ardıcıllıqların fonunda tanına (aşkar oluna) bilir.

Məsələn, insanın *SALL*1 genindən 500 kiloəsas qədər aşağıya yerləşən DNT ardıcıllığı insanlarda, siçanda, qurbağada, toyuqlarda və balıqlarda yüksək dərəcədə konservativliyə malikdir (Şəkil 9-10a). *SALL*1, üzvlərin normal inkişafı üçün tələb olunan transkripsiya faktorunu kodlaşdırır. β-qalaktozidaza reportyor geninə birləşmiş bu konservativ DNT ardıcıllığına malik olan transgen siçan yaradılarkən (Şəkil 9-10b) transgen rüşeyimlər β-qalaktozidaza reportyor geninini çox yüksək səviyyədə, xüsusən də inkişaf etməkdə olan əza buğumlarında ekspressiya olunmuşlar (Şəkil 9-10c). Genomunda bu rayonun silindiyi insan xəstələrində əzaların anormal inkişafı baş verir. Bu nəticələr göstərir ki, belə konservativ rayon *SALL*1 genin transkripsiyasını inkişaf etməkdə olan əzalarda istiqamətləndirir. Ehtimal ki, başqa transkripsiya-nəzarət rayonları bu genin transkripsiyasına, böyrəklərin, aşağı bağırsaqların və qulaqların normal inkişafında iştirak etdiyi başqa tip hüceyrələrdə nəzarət edir.

Transkripsiyaya nəzarət rayonlarının ardıcıllığı çox zaman təkamül prosesində qorunub saxlanıldığından, yəqin ki, spesifik hüceyrə tiplərində gen ekspressiyasını tənzimləmək üçün bu transkripsiya-nəzarət rayonlarına birləşən transkripsiya faktorları da təkamül prosesində qorunub saxlanmışlar. Bu, transgen siçanı hazırlamaqdan daha sadə, daha sürətli və daha ucuz başa gələn bir proseduru, transgen danio balığında reportyor-gen ekspressiyası ilə insan DNT-sində nəzarət rayonlarını analiz etməyə imkan verdi (Şıkil 9-9d). Eukariot hüceyrələrdə və eukariotik promotorlarda transkripsiyanı həyata keçirən zülalların müzakirəsindən sonra biz, bu cürə uzaqda yerləşən **enhanserlər** adlanan transkripsiya-nəzarət rayonlarının güman olunan funksiyasının müzakirəsinə qayıdacağıq.

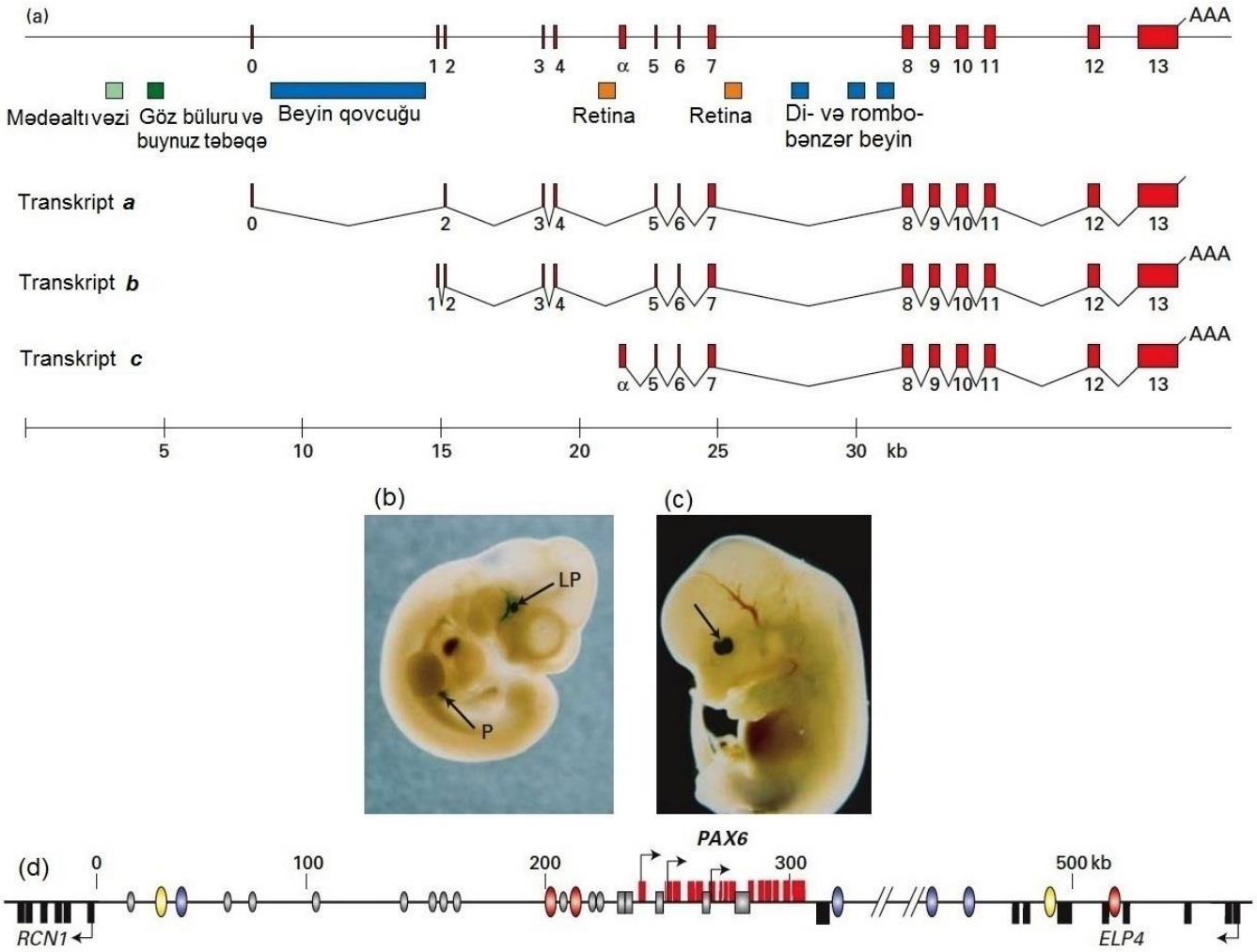
Üç Eukariot RNT Polimeraza Müxtəlif RNT-lərin Əmələ Gəlməsini Kataliz Edir

Bu vaxta qədər öyrənilmiş bütün eukariot hüceyrələrin (məsələn, onurğalıların, *Drosophila*, maya və bitki hüceyrələrin) nüvəsi I, II, və III kimi qeyd olunan üç müxtəlif RNT polimerazaya malikdir. Bu fermentlər ion-mübadiləsi xromotoqrafiyası zamanı müxtəlif duz qatılıqlarında elüsiya olunurlar, bu da onların fərqli xalis yükə malik olduqlarını əks etdirir. Üç polimeraza, bəzi göbələklər tərəfindən sintez olunan zəhərli tsiklik oktapeptid α-amanitinə qarşı olan həssaslığına görə də fərqlənirlər (Şəkil 9-11). RNT polimeraza I α-amanitinə qeyri həssasdır, amma RNT polimeraza II çox həssasdır – bu zəhər fermentin fəal mərkəzinə yaxın yerə birləşir və fermentin DNT templeyt boyu translokasiyasına (yerdəyişməsinə) mane olur. RNT polimeraza III isə orta həssaslığa malikdir.

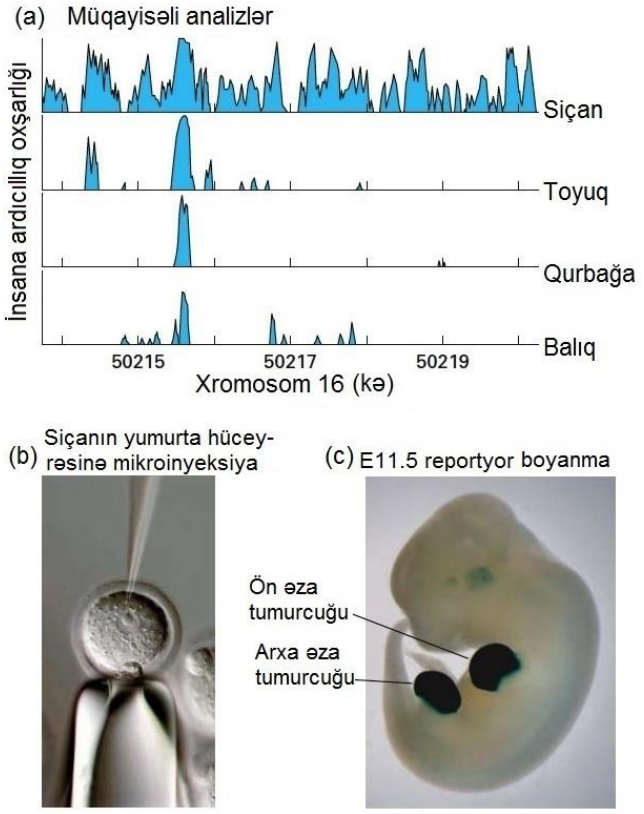
Hər bir eukariotik RNT polimeraza müxtəlif siniflərə aid olan RNT-ləri kodlaşdıran genlərin transkripsiyasını kataliz edir (Cədvəl 9-2). *RNT polimeraza I* (Pol I), nüvəcikdə yerləşir və sələf rRNT-ni (pre-rRNT) kodlaşdıran geni transkripsiya edib 28S, 5.8S və 18S rRNT-ləri istehsal edir. *RNT polimeraza III* (Pol III) tRNT, 5S rRNT və bir sıra kiçik stabil RNT-lərin, o cümlədən RNT splaysinqdə iştirak edən bir RNT-nin (U6) və yeni sintez olunmuş zülalı endoplazmatik şəbəkəyə istiqamətləndirən siqnal-tanıyan hissəciyin (SRP) bir komponenti olan RNT-nin (bax Fəsil 13) transkripsiyasını həyata keçirir. *RNT polimeraza II* (Pol II) bütün zülal kodlaşdıran genləri transkripsiya edir, belə ki o, mRNT-lərin istehsalında fəaliyyət göstərir. RNT polimeraza II həmçinin splaysinqdə iştirak edən beş kiçik nüvə RNT-lərdən dördünü və translokasiya nəzarətinə daxil olan mikro-RNT-ləri (miRNT) və eləcə də bunlara çox yaxın olan endogen kiçik müdaxil RNT-ləri (siRNT) (bax Fəsil 10) istehsal edir.

Bu üç eukariotik RNT polimerazaıların hər biri *E. coli* RNT polimerazasından daha mürəkkəb qururluşa malikdir, amma, bütün bu dörd çox-subvahidli RNT polimerazalar oxşar ümumi dizayna malikdirlər (Şəkil 9-12a, b). Eukariotların bütün üç RNT polimerazaları iki böyük subvahidə və 10-14 kiçik subvahidlərə malikdirlər, bu kiçik subvahidlərdən bəziləri polimerazaların ikisinin və ya hər üçünün arasında ümumidir.

Ən yaxşı xarakterizə olunmuş eukariotik RNT polimeraza *Saccharomyces cerevisisae* mayadadır. Polimerazanın subvahidlərini kodlaşdıran hər bir maya geni gen-nokaut mutasiyasına məruz qoyulmuşdur, nəticədə alınmış fenotip xarakterizə olunmuşdur.



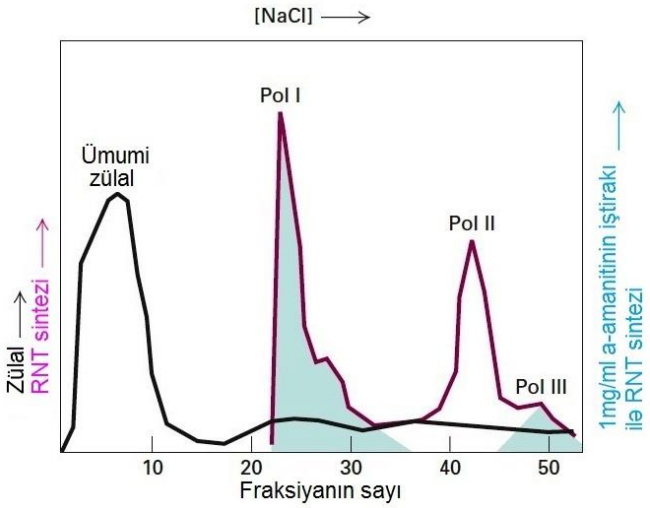
ŞƏKİL 9-9 Siçanın *Pax*6 geninin və insandakı ortoloqu *PAX6* genin transkripsiya-nəzarət rayonları. (a) Üç alternativ *Pax*6 promotorlar, siçanın inkişaf edən rüşeyimində embriogenezin müxtəlif dövrlərində müxtəlif spesifik toxumalarda istifadə edilmişdir. *Pax*6-nın müxtəlif toxumalarda ekspressiyasını tənzimləyən transkripsiya-nəzarət rayonları rənglənmiş düzbucaqlarla göstərilmişdir. Bu nəzarət rayonları təxminən 200-500 əsas cütü uzunluqdadır. (b) Eqzon 0-dan yuxarı 8 kə siçan DNT-sinə qovşaq olunmuş β-qalaktozidaza reportyor transgenin ekspressiyası. Reportyor Transgen siçanın embrionu mayalanmadan 10.5 gün sonra β-qalaktozidazanı aşkar etmək üçün X-qal ilə boyandı. Göz çuxuru (lens pit – LP) göz linzasının formalaşmasında inkişaf edən toxumadır. Ekspressiya mədəaltı vəzinin (P) yaranmasında inkişaf edən toxumalarda da müşahidə olunmuşdur. (c) Nişanlanmış torlu qişanın 4-cü və 5-ci eqzonları arasındakı (a) hissəsində göstərilən ardıcıllığın nəzarəti altındakı β-qalaktozidaza reportyor geninə malik olan 13.5 günlük rüşeyimdə β-qalaktozidazanın ekspressiyası. Oxlar inkişafda olan rüşeyimin burun və gicgah nahiyələrini göstərir. (d) İnsanın *Pax*6 transkripsiya-nəzarət rayonları insan DNT-sinin *RCN1* genindən yuxarı və ELP4-dən aşağıda olan promotor arasında 600-kə rayonunda identifikasiya olunmuşdur. *RCN1* və *ELP4* onların birinci eqzonu ilə assosasiya edən sola-isiqamətlənmiş oxlarla göstərildiyi kimi, PAX6-dan əks istiqamətdə transkripsiya olunurlar. *RCN1* və *ELP4* eqzonlar aşağıda insan DNT-sində bu rayonu təmsil edən xətdə qara dördbucaqlı ilə göstərilmişlər. *PAX6* eqzonlar xətdən yuxarıda qırmızı dördbucaqlılarla göstərilmişdir. Əvvəlcə siçanda xarakterizə olunmuş üç PAX6 promotor sağa istiqamətlənən ox başlıqları ilə göstərilir və (a)-da göstərilən mərkəzi rayon boz dördbucaqlılarla təsvir edilir. Ardıcıllığı bütün onurğalılarda qismən konservativ olan (Şəkil 9-10a-da olduğu kimi), genə cinah olan rayonlar oval işarə ilə göstərilir. Rənglənmiş oval işarələr danio balığın mərkəzi sinir sisteminin spesifik neyroanatomik lokalizasiyalarında transgenin ekspressiyasına səbəb olan ardıcıllıqları təmsil edir. Eyni rəngli oval işarələr eyni rayonda ekspressiyanı stimullaşdırır. Boz oval işarələr, inkişafda olan danio embrionunda reportyor genin ekspressiyasını stimullaşdırmayan və ya sınaqdan keçirilməyən konservativ ardıcıllıqları təmsil edirlər. Belə konservativ rayonlar yalnız kombinasiyada olanda fəaliyyət göstərə bilirlər, ya da onlar transkripsiyanın tənzimlənməsindən savayı digər səbəbdən, məsələn xromosomun topoloji domenlərdə düzgün qatlanması üçün qorunub saxlanılmışlar (bax Şəkil 8-34). [(a) hissəsi B. Kammendalet al., 1999, *Devel. Biol.* **205**:79-dən. (b) hissəsi Elsevier-in razılığı ilə B. Kammendal et al., "Distinct cis-essential modules direct the time-space patternof the Pax6 gene activity," *Developmental Biology*, 1999, **205**(1): 79–97-dən yenidən çap olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc vasitəsi ilə alınmışdır. (c) hissəsi nəzakətlə Peter Grussand Birgitta Kammandel tərəfindən verilmişdir. (d) hissəsi S. Batia et al., 2014, *Devel. Biol.* **387**:214-dən.]



ŞƏKIL 9-10 İnsanın SALL1 enhanseri inkişaf edən siçan rüşeymində reportyor genin ekspressiyasını əzaların uclarında fəallaşdırır. (a) İnsan genomu rayonlarında (insanın 16-cı xromosomunun ardıcıllığında 50214-50220.5 kə) sink-barmaq transkripsiya repressorunu kodlaşdıran SALL1 genindən təxminən 500 kə aşağıda yerləşən DNT ardıcıllığının qorunub saxlanmasının qrafiki təsviri. Təxminən 500 kə uzunluqda zülal kodlaşdırmayan ardıcıllıq balıqdan insana qədər konservativdir (qorunub saxlanılmışdır). Bu konservativ rayon da daxil olmaqla doqquz yüz əsas cütü uzunluqda insan DNT-si, *E. coli*-nin β-qalaktozidaza kodlaşdırıcı rayonun ardınca plazmidə keçirilmişdir. (b) Plazmid, siçanın mayalanmış yumurta hüceyrəsinin pro-nüvəsinə mikroinyeksiya olundu, sonra da, inyeksiya olunmuş reportyor-genlə-nəzarət olunan plazmid genli transgen siçan embrionunu yaratmaq üçün (yalançı)-boğaz siçanın uşaqlığına keçirildi (bax Şəkil 5-43). (c) İnkişafın 11.5 günündən sonra, uzların tumurcuqları inkişaf edib meydana gələndə sabit və keçirici hala gətirilən rüşeym X-qalda inkubasiya olundu, X-qal β-qalaktozidaza vasitəsi ilə həll olmayan kəskin mavi komponentə çevrildi. Nəticələr göstərdi ki, konservativ rayon β-qalaktozidaza reportyor genin güclü transkripsiyasını, spesifik olaraq uzların tumurcuqlarında stimullaşdıran enhanserə malikdir. [(a) hissəsi A. Visel et al., 2007. VISTA Enhancer Browser—adatabase of tissue-specific human enhancers. *Nucleic Acids Res*. **35**:D88–92-dən.(b)hissəsi ©Deco/ Alamy-dən. (c) hissəsi *Nature* razılığı iləPennacchio, L.A., et al., "In vivo enhancer analysis of human conserved noncodingsequences", *Nature*, 444, 499–506, 2006-dan yenidən çap olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc vasitəsilə alınmışdır.]

Bundan başqa, mayada RNT polimeraza II-nin üç-ölçülü quruluşu təyin edilmişdir (Şəkil 79-12b, c). Bu vaxta qədər öyrənilmiş bütün eukariotlarda üç nüvə RNT polimerazaları mayadakılara çox oxşardırlar. Bitkilər iki əlavə nüvə RNT polimerazalarına da (RNT polimeraza IV və V) malikdirlər, bunlar RNT polimeraza II-ə çox yaxındır, amma vahid bir böyük subvahidə və bəzi kiçik unikal subvahidlərə malikdirlər. Bu iki RNT polimeraza, bitkilərdə nüvə siRNT-lər tərəfindən istiqamətləndirilmiş transkripsiyanın repressiyasında fəaliyyət göstərirlər.

Bütün üç eukariot RNT polimerazaların iki böyük subvahidi (bitkilərdə RNT polimeraza IV və V həmçinin) bir-birinə yaxındır və *E. coli*-nin β′ və β subvahidləri ilə oxşardırlar (Şəkil 9-12a, b). Eukariotik polimerazaların hər biri həmçinin ω-bənzər və iki oxşar olmayan α-bənzər subvahidlərə də malikdirlər (Şəkil 9-13). RNT polimerazalarda bu özək subvahidlərin quruluşunun geniş oxşarlığı göstərir ki, bu fermentlər təkamülün erkən çağında yaranmış və əhəmiyyətli dərəcədə qorunub saxlanmışlar. Bu RNT-nin DNT-dən köçürülməsi kimi bir fundamental prosesi kataliz edən ferment üçün məntiqi gürünür. Onların özək subvahidlərinin *E. coli* RNT polimerazasının subvahidləri ilə oxşarlığından başqa, mayanın hər üç RNT polimerazası onlar üçün ümumi olan, amma bakterial RNT polimerazalar üçün olmayan dörd əlavə kiçik subvahidlərə də malikdirlər. Nəhayət, hər bir eukariotik nüvə RNT polimerazası digər iki nüvə RNT polimerazalarında olmayan, bir neçə ferment-spesifik subvahidlərə malikdirlər (Şəkil 9-13). Pol I və Pol III-də olan əlavə subvahidlərdən üçü



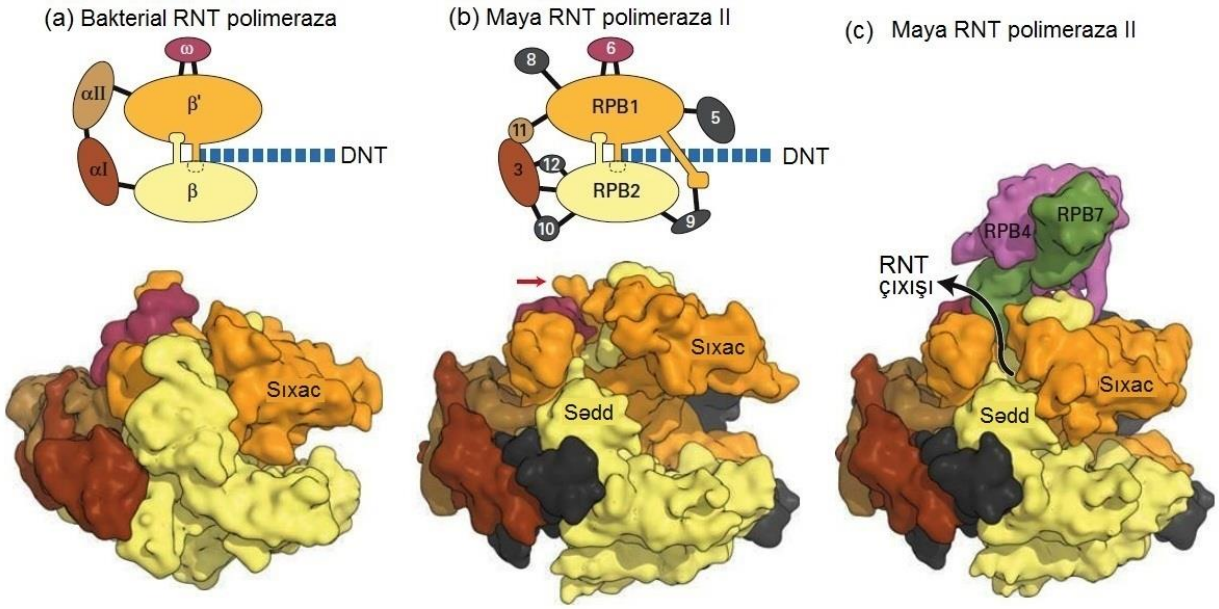
EKSPERIMENTAL ŞƏKIL 9-11 Maye xromotoqrafiyası, α-amanitinə hər-birinin öz xüsusi həssaslığı olan üç RNT polimerazanı ayırır və identifikasiya edir. Zülal kultura olunmuş eukariot hüceyrənin nüvəsindən DEAE-Sefadeks kolonkadan keçirilməklə ayrılır və adsorbsiya olunmuş zülallar NaCl-in qatılığının konstant artdığı məhlulla elusiya olunur (qara əyri). Kolonkadan toplanmış elusiya olunan fraksiyalar RNT polimeraza fəallığı 1μg/ml qatılığında α-amanitin iştirakı ilə (qırmızı əyri) və α-amanitin iştirakı olmadan (yaşıl gölgəli) yoxlanılmışdır. α-amanitinin bu qatılığı polimeraza II-nin fəallığını ingibirləşdirir, amma polimeraza I və III-ə təsir etmir. Polimeraza III 10μg/ml qatılığında α-amanitin ilə ingibirləşir, halbuki polimeraza I-ə hətta belə yüksək qatılıqd a təsir etmir. Bax, R.G. Roeder, 1974, *J. Biol. Chem*. **249**:241.

CƏDVƏL 9-2 Eukariotlarda Üç Nüvə RNT Polimerazası Tərəfindən Transkripsiya Olunan Nüvə RNT-ləri və Onların Funksiyası

Polimeraza	Transkripsiya olunan RNT	RNT funksiyası
RNT polimeraza I	Pre-rRNT (28S, 18S, 5.8S rRNT)	Ribosomun komponentləri, zülal sintezi
RNT polimeraza II	mRNT	Zülalları kodlaşdırır
	snRNTlər	RNT splaysingində iştirak edir
	siRNTlər	Xromatin-vasitəli repressiya, translyasiya nəzarəti
	miRNTlər	Translyasiya nəzarəti
RNT polimeraza III	tRENTlər	Zülal sintezi
	5S rRNT	Ribosom komponenti, zülal sintezi
	snRNT U6	RNT splaysinq
	7S RNT	Polipeptidləri endiplazmatik şəbəkəyə keçirmək üçün Siqnal-tanıyan hissəcik
	Digər stabil qısa RNTlər	Çoxsaylı müxtəlif naməlum funksiyalar

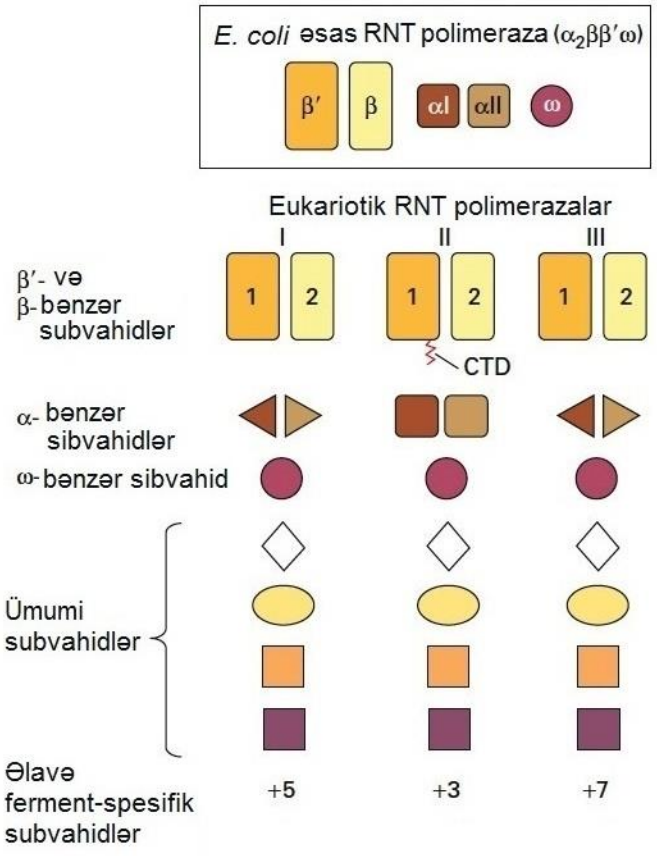
Pol II-spesifik üç əlavə subvahidrə homolojidirlər. Başqa iki Pol I-spesifik subvahid Pol II-nin, müzakirəsi sonra olunan əsas transkripsiya faktorlarına TFIIF-ə homolojidirlər, və Pol III-ün dörd əlavə subvahidi Pol II-nin əsas transkripsiya faktorlarından TFIIF və TFIIE-yə homolojidir. Görünür bunlar hüceyrədə Pol III ilə stabil assosasiya etmiş vəziyyətdədirlər və təmizlənmə zamanı ondan dissosasiya etmirlər.

RPBI-in *sıxac domeni* ona görə belə adlandırılmışdır ki, o iki müxtəlif vəziyyətdə, sərbəst Pol II fermentin kristalında (Şəkil 9-14a) və fermentin elonqasiya edən formasını təqlid edən kompleksdə (Şəkil 9-14b) müşahidə olunmuşdur. Polimerazanın bu rayonuna aşağıya istiqamətdə DNT daxil olarkən, bu domen yəqin ki, açıq olan həncama üzərində fırlanır və sonra, ferment özünün elonqasiya formasına keçərkən bağlanır. Belə fərz olunur ki, 8-9 əsas cütü uzunluqda DNT-RNT hibrid rayonu fəal

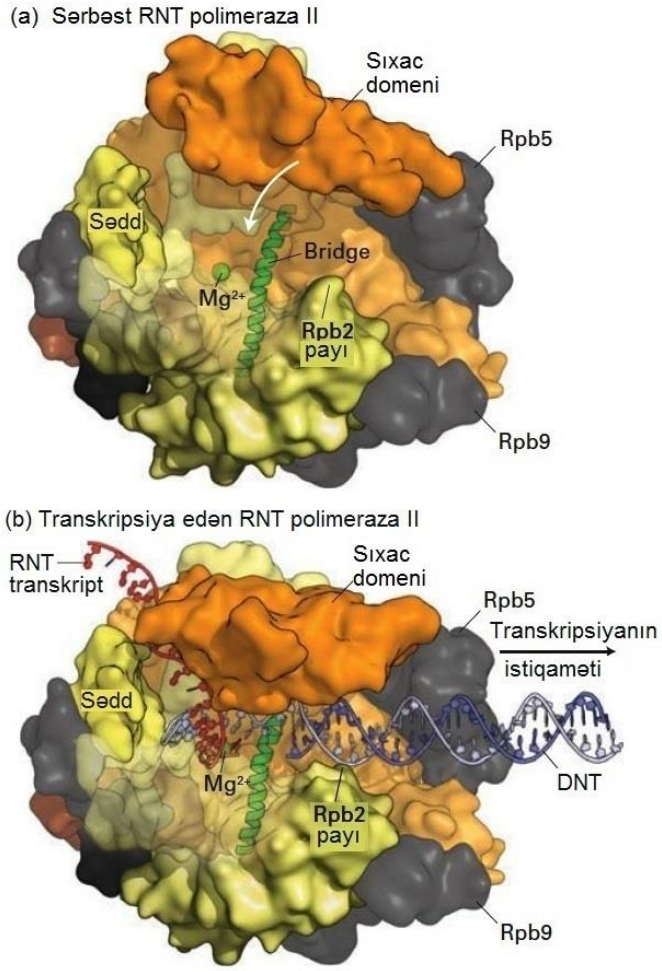


ŞƏKIL 9-12 Bakterial və eukariotik RNT polimerazaların üçölçülü quruluşunun müqayisəsi. (a, b) Bu fəza-doldurma modelləri rentgen-kristalloqrafiya analizlərinə əsaslanmışdır. (a) *T. acuatics* bakteriyasının RNT polimerazası. Bakterial fermentin beş subvahidi rəngləri ilə fərqlənirlər. Modeldə yalnız α-subvahidin N-sonluqlu domeni modelə daxil edilmişdir. (b) *S. cerevisiae*-dən RNT ploimeraza II. Maya RNT polimeraza II-ni təşkil edən 12 subvahiddən on subvahid bu modeldə göstərilmişdir. Konformasiyasına görə bakterial fermentdəkilərə oxşar olan subvahidlər eyni rəngdə göstərilmişlər. Böyük subvahid RPB1-in C-sonluq domeni kristal quruluşda müşahidə olunmamışdır, amma məlumdur ki, qırmızı oxla nişanlanmış mövqedən kənara çıxır. (RPB "RNT polimeraza B"-nin qısaldılmasıdır və RNT polimeraza II-ni göstərməyin alternativ yoludur.) Transkripsiya davam etdikcə polimerazaya daxil olan DNT sağ tərəfə diaqramda göstərilmişdir. (c) RNT polimeraza II-nin 4 və 7-ci subvahidləri də daxil olmaqla fəza-dolduran modeli. Bu subvahidlər fermentin (b)-də göstərilən böyük subvahidin C-sonluq domeni yaxınlığında mərkəzi hissəsindən (özəkdən) uzanır. [(a) hissəsi nəzakətlə Seth Darst tərəfindən; bax N. Korzheva et al.,2000, *Science* **289**:619–625. (b) hissəsi P. Cramer et al., 2001, *Science***292**:1863, PDB ID 1i50-dən. (c) hissəsi K. J. Armache et al., 2003, *P. Natl. Acad.Sci. USA* **100**:6964, and D. A. Bushnell and R. D.Kornberg, 2003, *P. Natl. Acad. Sci.USA* **100**:6969-dan.]

mərkəz yaxınlığında (o yerdıki RNT templeyt zəncirlə əsas cütü əmələ gətirir, bax Şəkil 9-14b) RBP1 və RBP2 arasında birləşir və sıxac domen öz qapalı vəziyyətində bağlanır, polimerazanı aşağıya istiqamətdə ikizəncirli DNT-yə bərkidir. Bundan başqa, müzakirə sonra olunacaq, transkripsiyanın DSIF adlanan elonqasiya faktoru elonqasiyanı aparan polimeraza ilə birləşir və sıxacı onun qapalı konformasiyasında saxlayır. Bunun nəticəsində, polimeraza qeyri-adi dərəcədə prosessiv (fəal) olur, demək olar ki, transkripsiyanın terminasiyasına qədər ribonukleotidlərin polimerləşməsuni dayanmadan davam etdirir. Terminasiyadan sonra və RNT çıxış kanalından çıxaraq azad olduqdan sonra, sıxac yellənərək açılır və fermenti templeyt DNT-dən azad edir (ayırır). Bu mexanizm, insanın RNT polimeraza II-in insanın ən uzun geni olan, təxminən 2 million əsas cütü uzunluqda olan, distrofini kodlaşdıran geni (*DMD*, bax Şəkil 1-31) dissosasiya etmədən və transkripsiyanı terminasiya etmədən necə transkripsiya etdiyini izah edə bilir. Transkripsiyanın elonqasiyası 1-2 kə/dəqiqə sürətlə getdiyindən *DMD* genin transkripsiyası təxminən tam bir gün tələb edir.

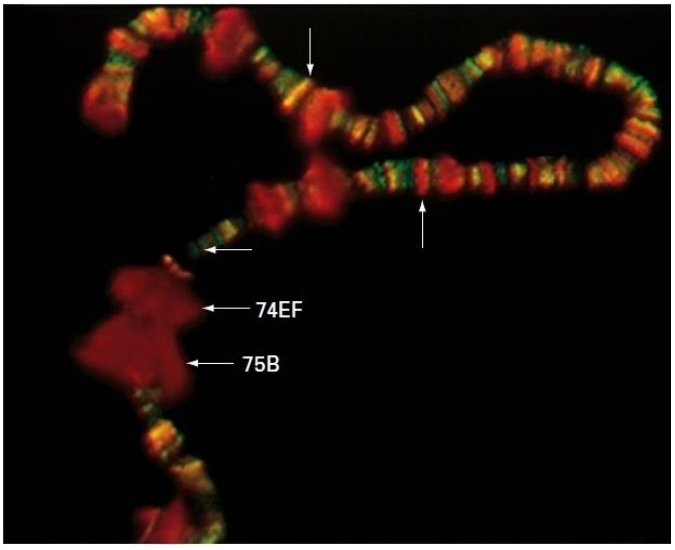


Şəkil 9-13 *E. coli*-nin əsas (özək) RNT polimerazanın və maya nüvə RNT polimerazaların subvahid quruluşunun sxematik təsviri. Hər üç maya polimerazaları, *E. coli* RNT polimerazanın β′, β, iki α və ω subvahidlərinə homoloji olan beş özək subvahidlərə malikdirlər. RNT polimeraza II-nin ən böyük subvahidi (RPB1) həmçinin C-sonluq domeninə (CTD) malikdir. RNT polimeraza I və III iki qeyri identik α-bənzər eyni subvahidlərə malikdirlər, RNT polimeraza II isə başqa qeyri-identik iki α-bənzər subvahidlərə malikdir. Hər üç polimeraza eyni ω-bənzər subvahidə və dörd başqa ümumi subvahidlərə malikdirlər. Bundan başqa, hər bir maya polimerazası üçdən yeddiyə qədər unikal subvahidlərə malikdirlər.



ŞƏKİL 9-14 RPB1-in sıxac domeni. Sərbəst (a) və transkripsiya edən (b) RNT polimeraza II-nin quruluşu, transkripsiya edən kompleks əmələ gələrkən polimerazanın çənələri arasındakı yarıq üzərində sallanan, DNT templeyt zəncirini və transkripti tutan RPB1 subvahidindəki sıxac domenin (narıncı) mövqeyinə görə fərqlənirlər. Sıxac domenin 8-9-əsas-cütlü RNT-DNT hibridinə birləşməsi sıxacın RNT-yə daha yaxın birləşməsinə kömək edə bilir və qapalı elonqasiya kompleksini stabilləşdirə bilir. RNT qırmızı rənglə, templeyt DNT zənciri tünd mavi rənglə, aşağıya doğru templeyt DNT zəncir isə abı rənglə göstərilmişdir. Aydınlıq üçün aşağıya istiqamətdə qeyri templeyt DNT göstərilmir. Sıxac aşağıya istiqamətdə gələn DNT-nin üstünü örtür. Yarığın bir tərəfini əmələ gətirən RBP2 hissəsi çıxarılmışdır ki, nuklein turşusu daha yaxşı görünə bilsin. Fosfodiefir əlaqələrin formalaşmasının katalizində iştirak edən Mg^{2+} ionları yaşıl rəngdə göstərilmişdir. Sədd RPB2-nin templeyt DNT-nin polimerazadan çıxmazdan öncə əyilməsi üçün onu polimerazanın sıxaclarına girməyə məcbur edən domenidir. Yaşıl rəngdə göstərilən α-spiral körpü polimerazada yarıq üzərindən uzanır (bax Şəkil 9-12b) və hesab edilir ki, polimeraza templeyt zəncir üzərində bir əsas aşağıya doğru yerini dəyişdikcə (translokasiya etdikcə) əyilir və düzəlir. Güman olunur ki, qeyri templeyt zəncir yarıqdan yuxarı dəyişkən bir-zəncirli rayonu əmələ gətirir (göstərilmir), uzunayan RNT-nin 3′ əsası ilə əsas-cütü əmələ gətirən templeytdan üç əsas aşağıya doğru uzanır, burada o templeyt zəncirlə hibridləşərək transkripsiya köpüyünü əmələ gətirir. [(a) hissəsi P. Cramer, D. A. Bushnell, and R. D. Kornberg, 2001, *Science* **292**:1863, PDB ID 1i50. (b) hissəsi A. L. Gnatt et al., 2001, *Science* **292**:1876, PDB ID 1i6h-dən.]

Maya göbələyində gen-nokaut təcrübələri göstərdi ki, üç nüvə RNT polimerazaların subvahidlərinin əksəriyyəti hüceyrənin həyat qabliyyəti üçün vacibdir. Həyat qabliyyəti üçün mütləq vacib olmayan bir neçə polimeraza subvahidləri geninin (məsələn, RNT polimeraza II-nin 4 və 7-ci subvahidlərinin) pozulması yenə də hüceyrələrin pis inkişaf etməsinə səbəb olur. Beləliklə, eukariotik RNT polimerazanın normal fəaliyyət göstərməsi üçün bütün subvahidlərin olması vacibdir. Eubakteriyalar kimi arxealar da, genlərin transkripsiyasında iştirak edən bir tip RNT polimerazaya malikdirlər. Amma, arexeaların RNT polimerazası, eukariotların nüvə RNT polimerazaları kimi ondan artıq subvahidlərə malikdir. Arxealar həmçinin, sonra müzakirə olunacaq, ümumi transkripsiya faktorları ilə də əlaqəlidir, bu da onların təkamülcə eubakteriyalardan daha çox eukariotlara yaxın münasibətdə olduğunu göstərir (Şəkil 1-1).



EKSPERIMENTAL ŞƏKIL 9-15 Anticismlə rəngləmə göstərir ki, RNT polimeraza II-nin karboksi-sonluq domeni (CTD) in vivo transkripsiya zamanı fosforlaşır. Tüpürcək-vəzin politen xromosomu *Drosophila*-nın süfrələrindın birbaşa qabıqdan çıxmazdan öncə hazırlanmışdır. Preparat dovşanın fosforlaşmış CTD-nə spesifik olan anticisminə və keçinin fosforlaşmamış CTD-nə spesifik anticisminin təsirinə məruz qoyulmuşdur. Sonra preparat, flüoressent-nişanlanmış anti-keçi anticismi ilə (yaşıl) və rodamin-nişanlanmış ant-dovşan anticismi (qırmızı) ilə rənglənmişdir. Beləliklə, fosforlaşmayan CTD-li polimeraza molekulları yaşıl rənglənir, fosforlaşmış CTD ilə olanlar isə qırmızı rənglənir. Qabıqdan çıxarma hormonu ekdison transkripsiyanı 74EF və 75B kimi nişanlanan şişmiş rayonlarda yüksək dərəcədə induksiya edir; qeyd etmək lazımdır ki, bu rayonlarda yalnız fosforlaşmış CTD-lər mövcuddur. Yüksək dərəcədə transkripsiya olunan kiçik şişmiş rayonlar da görünür. Qırmızı (yuxariya ox) və ya yaşıl (üfiqi ox) rənglənən şişməmiş saytlarda həmçinin həm qırmızı həm də yaşıl rəngləmə saytlarının sarı rəngi (aşağıya ox) əmələ gətirdikləri qeyd olunur.[J. R. Weeks et al., "Locus-specific variation in phosphorylation state of RNA polymerase II in vivo: correlations with gene activity and transcript processing," *Genes & Development*, 1993, 7(12A):2329–44-dən; nəzakətlə J. R. Weeks and A. L. Greenleaf-dən; Cold Spring Harbor Press razılığı ilə yen idən çap olunur.]

RNT Polimeraza II-nin Ən Böyük Subvahidi Zəruri Karboksi-Terminal Təkrara Malikdir

RNT polimeraza II-nin ən böyük subvahidi, RPB1-in karboksil sonluğu yeddi aminturşusu qalığından ibarət çoxsaylı dəqiq təkrarlanan sahəyə malikdir. Nə RNT polimeraza I nə də III bu təkrarlanan vahidlərə malik deyillər. **Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser** konsensus ardıcıllıqdan ibarət olan bu heptapeptid təkrar *karboksil-sonluq-domeni* (*karboxyl-terminal-domain - CTD*) kimi məlumdur (Şəkil 9-12b, qırmızı ox). Maya RNT polimeraza II belə 26 və daha artıq təkrarlara malikdir, onurğalıların fermenti isə 52 təkrara malikdir və bütün başqa eukariotların RNT polimeraza II-də təkrarların sayı bunların arasındadır. CTD həyat qabliyyəti üçün çox əhəmiyyətlidir və mayanın sağ qalması üçün təkrarların sayı ən azı 10 nüsxədə olmalıdır.

Model promotorla aparılmış in vitro təcrübələr ilk dəfə göstərdi ki, transkripsiyanı inisiasiya edən RNT polimeraza II molekulu fosforlaşmamış CTD-yə malikdir. Polimeraza transkripsiyanı inisiasiya edən kimi və promotordan kənara hərəkət etməyə başlayan kimi, CTD-də olan çox sayda serin və bəzi tirazin qalıqları fosforlaşırlar. *Drosophila* süfrələri qabıqdan çıxmamışdan öncə, transkripsiyanın fəal dövründə, onların tüpürcək vəzlərindən hazırlanmış politen xromosomların analizi göstərdi ki, CTD in vivo transkripsiya zamanı da fosforlaşır. İnkişafın bu zamanında induksiya olunmuş böyük xromosom "qatları" genomun fəal transkripsiya olunduğu rayonlardır. Fosforlaşmış və fosforlaşmamış CTD-yə spesifik anti-cismlərlə rənglənmə göstərdi ki, RNT polimeraza II-nin assosasiya etdiyi yüksək transkripsiya olunan şişmiş rayonları fosforlaşmış CTD-yə malikdirlər (Şəkil 9-15).

7.2 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Eukriotlarda Gen Nəzarətinə Ümumi Baxış

- Çoxhüceyrəli orqanizmlərdə gen nəzarətinin əsas məqsədi inkişafın elə dəqiqliklə yerinə yetirilməsidir ki, hüceyrənin embrional inkişafının və hüceyrə differensasiyasının düzgün dövründə düzgün genlər düzgün hüceyrələrdə ekspressiya olunsunlar.
- Transkripsiyaya nəzarət bakteriyalarda olduğu kimi, eukariotlarda da gen ekspressiyanın tənzimlənməsinin əsas vasitəsidir.
- Eukariotik genomlarda, DNT transkripsiya-nəzarət elementləri onların tənzimlədikləri promotordan bir çox kiloəsas kənarda yerləşə bilirlər. Eyni genin transkripsiyasına müxtəlif hüceyrələrdə müxtəlif nəzarət rayonarı nəzarət edə bilir.
- Eukariotlar üç müxtəlif tipli nüvə RNT polimerazasına malik olurlar. Onların hər üçü, *E. coli*-nin RNT polimerazasının β′, β, α, və ω subvahidlərinə homoloji olan iki böyük və üç kiçik özək (əsas) subvahidlərinə və həmçinin əlavə kiçik subvahidlərə malikdirlər (bax Şəkil 9-13).
- RNT polimeraza I yalnız pre-rRNT-ni sintez edir. RNT polimeraza II mRNT-ni, mRNT-nin spalysinqində iştirak edən bəzi kiçik nüvə RNT-lərini, komplementar mRNT-nin translyasiyasını tənzimləyən mikro-RNT-ləri (miRNT) və komplementar mRNT-lərin stabilliyini tənzimləyən

müdaxil-RNT-lərini (siRNT) sintez edir. RNT polimeraza III tRNT-ləri, 5S rRNT-ni, və bir sıra nisbətən qısa stabil RNT-ləri (bax Cədvəl 9-2) sintez edir.

- RNT polimeraza II-nin ən böyük subvahidinin Karboksil-sonluqlu domeni (CTD) transkripsiyanın inisiasiyası zamanı fosforlaşır və ferment templeyti transkripsiya etdiyi müddətdə fosforlaşmış vəziyyətdə qalır.

9.3 RNT Polimeraza II-nin Promotorları və Əsas Transkripsiya Faktorları

Transkripsiyanın RNT polimeraza II ilə inisiasiyasını və elonqasiyasını tənzimləyən mexanizmlər geniş öyrənilmişdir, çünki bu polimeraza mRNT-ləri transkripsiya edir. RNT polimeraza II ilə transkripsiyanın inisiasiyası və elonqasiyası zülal kodlaşdıran genlərin ekspressiyası üçün ilkin biokimyəvi proseslərdir və spesifik zülalların nə vaxt və hansı hüceyrədə sintez olunduğunu təyin etmək üçün gen ekspressiyasında ən çox tənzimlənən pillələrdir. Əvvəlki bölmədə göstərildiyi kimi, zülal kodlaşdıran eukariot genlərin ekspressiyası, ümumən transkripsiya-nəzarət rayonları adlandırılan çoxsaylı zülal-birləşdirən DNT ardıcıllıqları ilə tənzimlənir. Bu ardıcıllıqlara, DNT templeytın transkripsiyasınaın harada başlamasını təyin edən və transkripsiyanın start saytına yaxın yerləşən promotorlar və eləcə də tənzimlədikləri gendən çox uzaqda yerləşən və hansı genin, nə qədər tez-tez transkripsiya olunduğu hüceyrə tipinə nəzarət edən başqa tip nəzarət elementki enhanserlər daxildir. Biz bu bölmədə, eukariot hüceyrələrin zülal-kodlaşdıran genlərində tapılmış müxtəlif transkripsiya-nəzarət elementlərinin xassələrinə və onları təyin etmək üçün istifadə olunan metodlara yaxından baxacağıq.

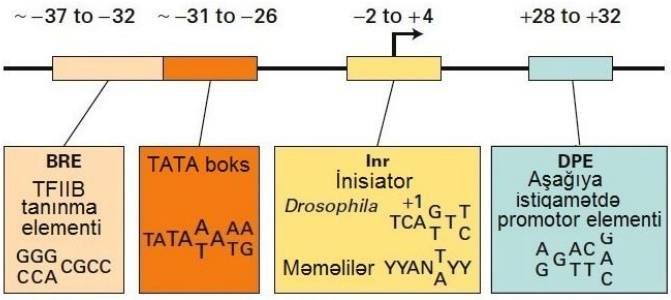
RNT Polimeraza II mRNT-nin 5′ Papağına Uyğun Olan DNT Ardıcıllıqlarında Transkripsiyanı İnisiasiya Edir

Kulturada yetişdirilmiş hüceyrələrin nüvəsinin zülal ekstraktından alınan təmizlənmiş RNT polimeraza II-dən və bir sıra çox geniş ekspressiya olunan genlərin mRNT-lərinin 5’ sonluğunu kodlaşdıran ardıcıllığa malik olan DNT templeytdən istifadə edərək aparılmış in vitro eksperimentlər aşkar etdi ki, istehsal olunan transkriptlər həmişə 5′ sonluqlarında həmin genlərdən in vivo ekspressiya olunan splays olunmuş mRNT-nin 5′ sonluqlarındakına identik olan papaq quruluşa malik olurlar (bax Şəkil 5-14). Bu eksperimentlərdə 5′ papaq nüvə ekstraktındakı fermentlərlə yeni sintez olunan RNT-nin 5′ sonluğuna əlavə olunur və papaq yalnız 5′ tri- və ya difosfat olan RNT-yə əlavə olunur. Çünki, uzun RNT-nin parçalanması yolu ilə alınan 5′ sonluq 5′ monofosfata malik olur, ona görədə ona papaq əlavə oluna bilməz. Bunun nəticəsində, tədqiqatçılar belə xülasəyə gəldilər ki, in vitro transkripsiya reaksiyası zamanı papaq tikilmiş nukleotidlər transkripsiyanın inisiasiya olunduğu nukleotidlərlə olmalıdır. Ardıcıllıq analizləri aşkar etdi ki, verilmiş gen üçün, in vitro istehsal olunmuş RNT transkriptinin 5′sonluğunda olan ardıcıllıq hüceyrələrdən ayrılmış mRNT-nin 5′ sonluğu ilə eyni olmalıdır və bu təsdiq edir ki, eukariot mRNT-nin papaq nukleotidləri transkripsiyanın start saytı ilə üst-üstə düşür. Bu gün, yeni xarakterizə olunmuş mRNT-lər üçün transkripsiyanın start saytı əsasən, sadəcə olaraq kodlaşdırılan mRNT-dəki 5′ papaq nukleoidlərini kodlaşdıran DNT ardıcıllığını müəyyən etməklə təyin edilir.

TATA Boks, İnisiator və CpG Adalar Eukariot DNT-də Promotor kimi Fəaliyyət Göstərirlər

Bir neçə müxtəlif tip DNT ardıcıllıqları RNT polimeraza II üçün promoter kimi fəaliyyət göstərərək, polimerazaya iki-zəncirli DNT molekulunun templeyt zəncirinə komplementar olan RNT-nin transkripsiyasını harada inisiasiya etmək lazım olduğunu deyir. Bu ardıcıllıqlara **TATA bokslar, inisiatorlar və CpG adalar** daxildirlər.

TATA Bokslar İlk dəfə ardıcıllığı oxunan və in vitro transkripsiya sistemləri ilə öyrənilən genlər virus genləri və hüceyrə tsiklinin verilmiş xüsusi zamanında və ya spesifik differensasiya etmiş hüceyrə tiplərində çox fəal transkripsiya edən hüceyrənin zülal-kodlaşdıran genləri olmuşdur. Yüksək dərəcədə transkripsiya olunan bütün bu genlərdə **TATA boks** adlanan konservativ ardıcıllıq transkripsiyanın start saytından təxminən 26─31 əsas cütü yuxarıya doğru tapılmışdır (Şəkil 9-16). Mutagenez tədqiqatları göstərdi ki, bu nukleotid ardıcıllığında vahid bir əsasın dəyişilməsi ilə TATA boksa bitişik olan yaxın genin RNT polimeraza II ilə in vitro transkripsiyası kəskin surətdə azalmışdır. Əgər TATA boksla normal transkripsiya start saytı arasında əsas cütləri silinərsə dəyişilmiş qısa templeytda transkripsiya TATA boksdan 25 əsas cütü aşağıya doğru yeni saytda başlayacaqdır. Bunun nəticəsində, *E. coli* promotorunda olduğu kimi, TATA boks transkripsiyanın inisiasiyası üçün RNT polimeraza II-nin mövqeyinə təsir edir (bax Şəkil 5-12).



ŞƏKİL 9-16 Metazoanlarda qeyri CpG ada promotorlarında əsas promotor elementləri. Zəncirin ardıcıllığı, 5′ sonluğu sol tərəfə, 3′ sonluğu isə sağ tərəfə göstərilmişdir. TATA-boks promotorunda daha çox müşahidə olunan əsaslar iri hərflərlə göstərilir. A^{+1} transkripsiyanın başlandığı əsasdır, Y pirimidini (C və ya T), N isə istənilən dörd nukleotiddən birini bildirir. [S.T. Smale and J.T. Kadonaga, 2003, *Ann.Rev.Biochem*. **72**:449 götürülümşdür.]

İnisiator Ardıcıllıq Bəzi eukariot genlər TATA boks əvəzinə, **inisiator** adlanan alternativ promoter elementinə malik olurlar. Təbii şəkildə ən çox rast gəlinən inisiator elementlrində –1 mövqeyində sitozin (C) qalığına və transkripsiyanın start saytında +1 mövqeyində isə adenin (A) qalığına malik olurlar.

Məməlilərin genində inisiatora malik olan promotorla yönəldilmiş mutagemez aşkar etdi ki, start saytın birbaşa ətrafındakı əhatə edən nukleotid ardıcıllığı belə promotorun gücünü müəyyən edir. Amma, konservativ TATA boks ardıcıllıqdan fərqli olaraq, yalnız son dərəcə cırlaşan inisiator consensus ardıcıllıq müəyyən edilmişdir:

(5′)Y-Y-A^{+1}-N-T/A-Y-Y-Y(3′)

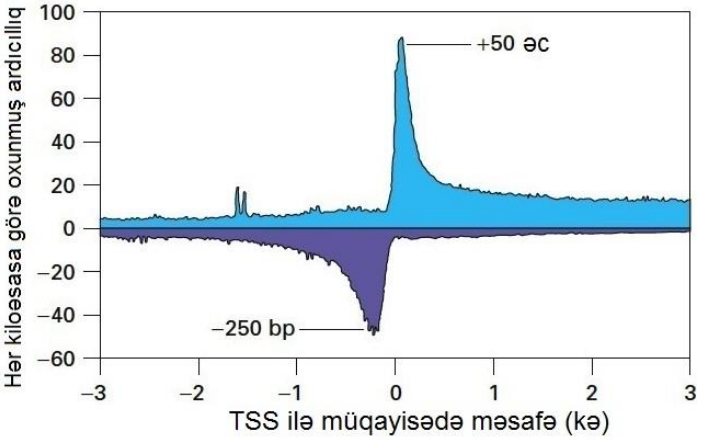
burada A^{+1} transkripsiyanın başlandığı əsasdır, Y istənilən pirimidindir (C və ya T), N dörd əsasdan hər hansı biridir, və T/A isə +3 vəziyyətində T və ya A olduğunu göstərir. Bizim, sonra görəcəyimiz kimi, BRE və DPE kimi işarələnən başqa promotor elementləri əsas transkripsiya faktorları ilə birləşə və promotorun gücünə təsir edə bilirlər (Şəkil 9-16).

CpG Adalar TATA boksa və inisiator elementlərinə malik olan promotorlu genlərin transkripsiyası yaxşı təyin edilmiş inisiator saytından başlayır. Amma, məməlilərdə zülal-kodlaşdıran genlərin əksəriyyətinin (~70 faizi) transkripsiyası TATA boks və insiatorla müqayisədə aşağı sürətə malik olan promotorla, qeyri adi dərəcədə yüksək tezlikdə CG ardıcıllığına malik olan promotorda baş verir və təxminən 100-1000 əsas cütü rayonunda olan bir neçə alternativ start saytlarından başlayır. Belə genlər, çox hallarda böyük miqdarda tələb olunmayan zülalları (məsələn, bütün hüceyrələrdə tələb olunan əsas metabolik yollarda tələb olunan fermentləri, bunlara "evdarlıq genləri" deyilir) kodlaşdırırlar. Bu promotor rayonları **CpG adalar** adlandırılır (burada "p" C və G arasındakı fosfatı göstərir), çünki onlar məməlilərin genom ardıcıllığında seyrək rast gəlinir.

Məməlilərdə, CpG ada promotorla əlaqəli olmayan, dalınca G gələn C-lərin əksəriyyəti pirimidin həlqəsinin 5-ci vəziyyətində metilləşir (5-metil C, C^{Me} kimi təmsil olunur; bax Şəkiln 2-17). Güman olunur ki, CG ardıcıllıq məməlilərin genomunda kifayət qədər təsvir olunmamışdır, çünki 5-metil C-nin spontan deaminləşməsi timidini yaradır. Məməlilərin təkamülü zamanından əvvəl, güman olunur ki, bu DNT reparasiyası mexanizmi ilə GC-lərin əksəriyyətinin TG-lərə çevrilməsinə gətirib çıxarmışdır. Bunun nəticəsində, insan genomunda CG-lərin rast gəlmə tezliyi, C-lərin ardınca G-lərin təsadüfi gözlənilən gəlmə ehtimalı cəmisi 21 faizidir. Amma, fəal CpG ada promoterlərində C-lər metilləşməmiş formadadırlar. Ona görə də, onların spontan şəkildə deaminləşməsi onları U-ya çevrir, və DNT reparasiya sistemi bu əsası tanıyaraq onu yenidən geriyə, C-ə çevirir. Nəticədə, CpG ada promotorunda CG ardıcıllığın tezliyi, C-nin ardınca gələn digər üç nukleotiddən istənilən birinin təsadüfi gəlməsi tezliyinə yaxındır.

CG-zəngin ardıcıllıqların histon oktamerlərlə birləşməsi CG-zəngin olmayan ardıcıllıqların birləşməsindən çox zəifdir, çünki onların histon oktamerlər ətrafında dolanması və nukleosomları formalaşdırması üçün tələb olunan kiçik diametrli ilgəkdə əyiməsi daha çox enerji tələb edir (Şəkil 8-24). Bunun nəticəsində, CpG adalar DNT-nin nukleosomsuz rayonları ilə üst-üstə düşür. CpG adalara malik olan promotordan transkripsiyanın başlanmasına nəzarətin molekulyar mexanizmi barədə çox şey hələ öyrənilməmişdir, amma, müasir fərziyyələr ondan ibarətdir ki, növbəti bölmədə müzakirə olunan əsas transkripsiya faktorları onlara birləşə bilir, çünki onlar nukleosomdan kənardadırlar.

CpG Ada Promotorlardan Divergent Transkripsiya CpG adaların tez nəzərə çarpan başqa xüsusiyyəti transkripsiyanın iki istiqamətdə inisiasiya olunmasıdır, baxmayaraq ki, yalnız sens zəncirin transkripsiyası funksional mRNT-ni verir. Öz izahını gözləyən mexanizm(lər)ə görə, "səhv" istiqamətdə transkripsiya edən (məsələn, qeyri-sens zənciri transkripsiya edən) RNT polimeraza II molekullarının əksəriyyəti transkripsiya başlanma saytından təxminən 1-3 kə sonra transkripsiyaya aram verir və ya dayandırır (terminasiya edir). Bu fenomen, RNT-DNT hibridin fəal mərkəzə yaxın birləşməsi zamanı RNT polimeraza II-nin sıxac domeni tərəfindən elonqasiya kompleksinə verilmiş stabillikdən istifadə edərək aşkar olunmuşdur (Şəkil 9-14 b, c).



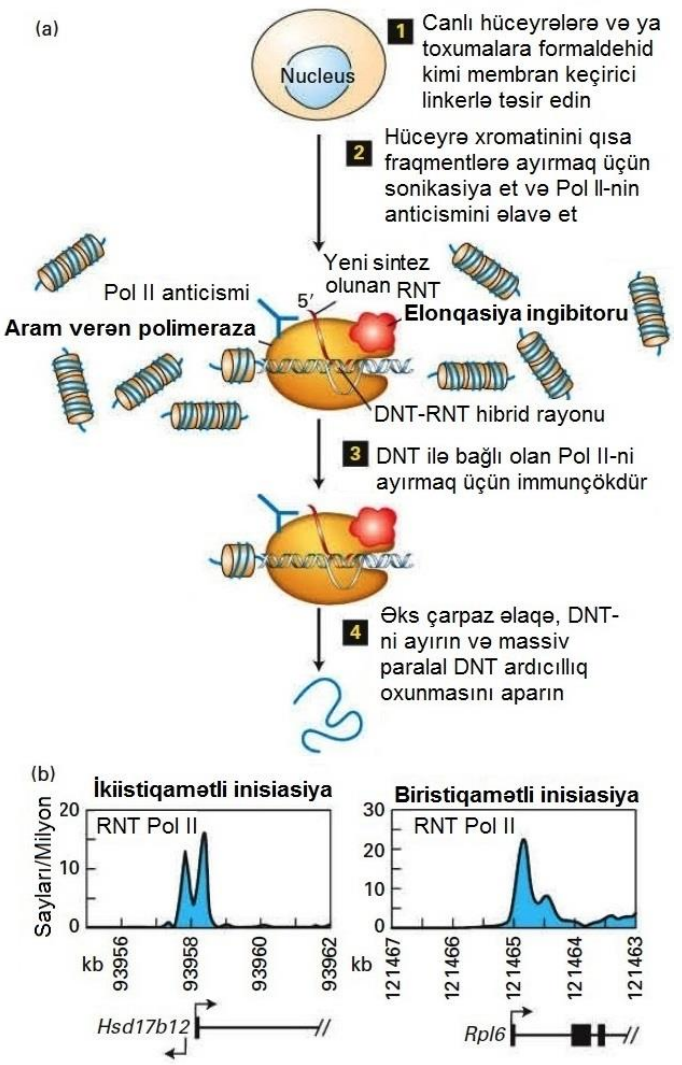
EKSPERIMENTAL ŞƏKIL 9-17 İnsan fibroblastında elonqasiyanı aparan RNT polimeraza II molekulunun analizi. Kultura olunmuş fibroblastlarin nüvəsi ayrılaraq tərkibində, RNT polimeraza II-nin transkripsiyanı inisiasiya etməsinə mane olan qeyri ionlaşdırıcı detergent olan buferdə inkubasiya olundu. Təsir edilmiş nüvə ATP, CTP, GTP və Br-U ilə 5 dəqiqə müddətində 30 ºC-də inkubasiya olundu, seçilmiş zaman müddəti təxminən 100 nukleotidin RNT-də birləşməsinə kifayət edəcəkdir. Sonra RNT ayrılaraq, yüksək pH altında nəzarət olunan inkubasiya ilə təxminən 100 nukleotid uzunluqda fraqmentlərə bölündü. Xüsusi RNT oliqonukleotidlər RNT fraqmentlərinin 5′ və 3′ sonluqlarına liqasiya olundu və alınan RNT geriyə transkriptazaya məruz qoyuldu. Nəticədə alınan DNT polimeraza zəncirvari reaksiya ilə amplifikasiya olundu və ardıcıllığın oxunması kütləvi paralel DNT ardıcıllıq oxunması metodu ilə aparıldı. Təyin olunmuş ardıcıllıqlar bütün məlum olan insan genlərinin transkripsiyanın start saytına (TSS) düzüldü və oxunan ardıcıllıqların sayı ümumi ardıcıllığı oxunmuş DNT-də hər kilo əsasa görə sens transkripti (mavi) və antisens transkripti (bənövşəyi) 10 əsas cütü intervalında diaqrama köçürüldü. Müzakirə üçün tekstə bax. [L.J. Core, J.J. Waterfall and J.T. Lis, 2008, *Science*,**322**/1845-dən.]

İnsanın kultura olunmuş fibroblast hüceyrələrindən nüvə ayrılaraq, tərkibində elonqasiya etməyən RNT polimerazaları uzaqlaşdıran duz qatılığı və yüngül detergent olan bufer məhlulunda inkubasiya olunmuşdur, bu zaman elonqasiya prossini aparan polimerazanın templeyt DNT ilə stabil assosasiyası onun mühitdə qalmasını təmin edir. Sonra nukleotid trifosfatlar, əlavə olunduqda, bunlardan UTP, urasilin pirimidin həlqəsində 5 mövqeyində Br atomu birləşən brom-UTP (bax

Şəkil 2-17) ilə əvəz edildi. Bundan sonra, nüvə 30 ºC-də kifayət qədər müddətə inkubasiya olundu ki, nüvənin ayrıldığı zaman transkripsiyanın elonqasiyası prosesində olan RNT polimeraza II (Pol II) molekulları vasitəsi ilə təxminən 100 nukleotid polimerləşə bilsin. İnkibasiyadan sonra RNT ayrıldı, və tərkibində brom-U olan RNT brom-U ilə nişanlanmış RNT-yə spesifik anticismlə immunoçökdürüldü. Bu RNT-lərin 5′ sonluğunda otuz üç nukleotid uzunluqda ardıcıllıq geriyə transkriptlərin kütləvi parallel DNT ardıcıllıq oxunması metodu (bax Fəsil 6) ilə oxundu və alınan ardıcıllıqlar insan genomuna xəritələşdirildi.

Şəkil 9-17 insanın hal-hazırda məlum olan bütün zülal-kodlaşdıran genlərinin əsas transkripsiya start saytlarına (TSS) uyğun gələn ümumi BrU-nişanlanmış RNT-nin oxunmuş çoxsaylı ardıcıllıqlarını kilo əsaslarla göstərir. Nəticələr göstərir ki, təxminən eyni suda RNT polimeraza molekulları həm sens istiqamətdə (mavi, sens istiqamətdə transkripsiyanı göstərmək üçün yuxarıya doğru diaqramlaşdırılmış) həm də antisens istiqamətdə (bənövşəyi, əks antisens istiqamətdə transkripsiyanı göstərmək üçün aşağıya doğru diaqrammlaşdırılmışdır) promotorların çoxunu (əsasən də CpG ada promotorlarını) transkripsiya etmişlər. Sens transkriptlərin əsas transkripsiya start saytlarına uyğun olan piki təxminən +50-də müşahidə olunmuşdur, bu onu göstərir ki, Pol II +50-dən +200-ə qədər rayonda elonqasiyanı davam etdirməzdən öncə aram verir. –250-dən –500 qədər olan rayonda antisens istiqamətdə transkripsiya edən Pol II-nin əsas sens transkripsiya start saytlarına uyğun olan piki də müşahidə olunmuşdur, bu da nukleosomdan azad rayonun digər ucunda CpG ada promotorunda aram verən RNT polimeraza II molekullarını aşkar edir. Qeyd etmək lazımdır ki, oxunmuş ardıcıllıqların sayı və ona görə də elonqasiya edən polimerazaların sayı antisens istiqamətdə start saytdan başlayaraq 1 kə-dan artıq transkripsiya edən polimerazalar üçün sens istiqamətdə start saytdan başlayaraq 1 kə-dan artıq transkripsiya edən polimerazalarla müqayisədə daha azdır. Potensial olaraq bu fərqlərə görə olan molekulyar mexanizm(lər) transkripsiyanın terminasiyasının müzakirə olunduğu Şəkil 10-15-də təqdim edilir. Qeyd edək ki, az sayda ardıcıllıq oxunması həmçinin, əsas transkripsiya start saytlarından yuxarıya istiqamətdə (0-dan sola tərəf mavi rəngli ardıcıllıq oxunmaları və 0-dan sağa tərəf bənövşəyi rəngli ardıcıllıq oxunmalar) olan transkripsiyada da müşahidə olunmuşdur və bu göstərir ki, bütün genom boyu zahirən təsadüfi saytlardan olan transkripsiyanın səviyyəsi çox aşağıdır. Son zamanlar CpG ada promotorlardan olan divergent transkripsiyanın və eukariotların genomunun əksəriyyətinin aşağı səviyyədə transkripsiyasının bu cürə kəşfləri tədqiqatçıların çoxu üçün böyük sürpriz oldu.

Xromatin immunçökdürmə Şəkil 9-18a-da təsvir olunmuş, RNT polimeraza II anticismindən istifadə etməklə aparılmış xromatin immunçökdürmə metodu, məməlilərin CpG ada promotorlarının çoxunda divergent transkripsyanın baş verdiyini təsdiq edən əlavə məlumatları (verilənləri) təmin etdi. Bu analizlərdən alınan verilənlər genomun bu rayonunda təyin olunmuş spesifik ardıcıllığının, analiz olunan hər milyon ümumi ardıcıllıqda dəfələrlə sayı kimi göstərilir (Şəkil 8-18b). Aralıq (intermediatory) metabolizmdə iştirak edən fermenti kodlaşdıran *Hsd17b12* geni kimi divergent transkripsiya olunan genlərdə, immun çökdürülmüş DNT-nin sens və antisens istiqa-

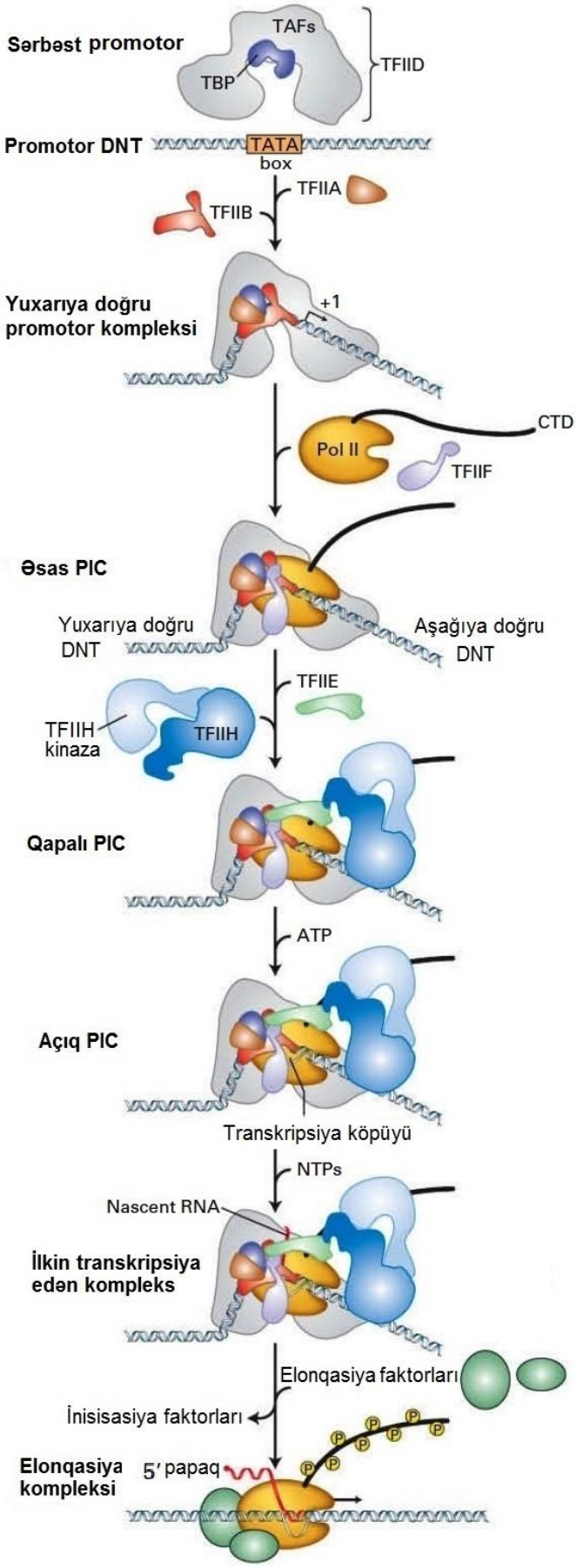


EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 9-18 Xromatin immunçökdürmə metodu maraq zülalının genomda assosasiyada olduğu yeri aşkar edir. (a) Pillə 1: Kultura olunan canlı hüceyrələr və ya toxumalar, zülalları DNT-yə və zülalları zülallara kovalent tikmək üçün 1% formaldehiddə inkubasiya olunur. Pillə 2: Sonra, xromatini həll etmək və 200-dən 500 əsas cütünə qədər DNT fraqmentlərinə bölmək üçün preparat sonikatorda sonikasiya olunur. Pillə 3: Maraq zülalının, indiki halda RNT polimeraza II-nin anticismi, əlavə olunur və maraq zülalına kovalent birləşmiş DNT immunçökdürməyə məruz qoyulur. Pillə 4: Sonra kovalent əlaqə qırılır və DNT ayrılır. Ayrılmış DNT fraqmenti maraq ardıcıllığı praymerlərindən istifadə edərək polimeraza zəncirvari reaksiya ilə analiz oluna bilər. Alternativ olaraq, bərpa olunmuş total DNT amplifikasiya oluna, flüoressent nişanlanmış nukleotidlərlə birləşməklə nişanlana və mikroarrey hibridləşməsində istifadə oluna bilər (Şəkil 6-27) və ya kütləvi parallel DNT ardıcıllıq oxunmasında istifadə oluna bilər. Bax A. Hecht and M. Grunstein, 1999, *Method. Enzymol*. **304**:399. (b) Siçanın embrional sütun hüceyrələrində RNT polimeraza II spesifik anticismlə immunçökdürülmüş xromatinin DNT ardıcıllığının oxunması nəticələri divergent transkripsiya olunan genlər üçün (*solda*) və yalnız sens istiqamətdə transkripsiya olunan genlər üçün (*sağda*) göstərilir. Nəticələr DNT ardıcıllığının 50 əsas cütü intervalda əsas cütü oxunmuş hər milyon ardıcıllıqda müşahidə olunmuş dəfələrin sayı kimi diaqramlaşdırılmışdır. Genin 5′ ucunu kodlaşdıran rayon, eqzonlar düzbucaqlı, intronlar isə xətlər şəkilində olmaqla aşağıda göstərilmişdir. [(b) hissəsi P.B. Rahl et al., 2010, *Cell*, **141**:432.]

mətlərdə Pol II ilə aparılan transkripsiyaya uyğun olan, iki piki aşkar olunmuşdur. Amma, Pol II yalnız sens istiqamətində start saytdan 1 kə-dan artıq olan ölçüdə aşkar olunmuşdur. Genomun bu rayonundan hər milyona görə hesablamaların sayı çox aşağı olmuşdur, çünki gen çox aşağı tezlikdə transkripsiya olunmuşdur. Amma, start-sayt rayonunda hər milyona görə hesablamaların sayı həm sens həm də antisesns transkripsiyalar üçün çox yüksək olmuşdur, bu da, Pol II molekulların transkripsiyanı bu promotordan hər iki istiqamətdə inisiasiya etdiyi faktları əks etdirir, amma hər istiqamətdə 500 əsas cütlərinə qədər transkripsiya edən kimi aram vermişdir. Bunun əksinə, böyük ribosomal subvahidin zülalını kodlaşdıran və siçanın proliferasiya etmiş embrion sütun hüceyrələrində çox transkripsiya olunan *Rpl6* geni demək olar ki, yalnız sens istiqamətdə transkripsiya olunmuşdur. Transkripsiyanın başlanğıc saytından hər milyona düşən 250 əc-dən az piklərin sayı polimerazanın yenidən genin transkripsiyası üçün azad olmasından öncə promotora-yaxın rayonda transkripsiyanın uzun sürən aram verməsi nəticəsində yaranır. Transkripsiyanın start saytından aşağıya doğru hər milyona görə olan 1 kə-dan böyük ardıcıllığın sayı sens-istiqamətdə *Hsd17b12* genin transkripsiyasında daha yüksək olmuşdur, bu da *Rpl6* genin yüksək dərəcədə transkripsiya olunduğunu əks etdirir.

Əsas Transkripsiya Faktorları RNT Polimerasa II-nı Start Sayta Yerləşdirir və İnisiasiyaya Kömək Edir

Transkripsiyanın RNT polimeraza II ilə inisiasiyası bir sıra inisiasiya faktorlarını tələb edir. Bu inisiasiya faktorları Pol II molekulunun transkripsiya saytında yerini müəyyən edir və DNT-nin ikiqat zəncirinin ayrılmasına və beləliklə templeyt zəncirin fermentin fəal mərkəzinə girə bilməsinə kömək edir. Bunlara *əsas transkripsiya faktorları* deyilir, çünki onlar demək olar ki, əksər, bəlkə də bütün RNT polimeraza II ilə transkripsiya olunan promotorlarda tələb olunurlar. Bu zülallar, TFIIA, TFIIB və sair ilə işarə olunurlar və onların əksəriyyəti multimer zülallardır. Onların ən böyüyü TFIID-dir, o bir 38 kDa *TATA boks birləşdirən zülaldan* (*TBP*) və 13 TBP-assosasiyalı faktorlardan (TAF-lar) təşkil olunub. Eyni fəallığa və homoloji ardıcıllığa malik olan əsas transkripsiya faktorları bütün eukariotlarda tapılmışdır. Promotora birləşmiş Pol II kompleksi



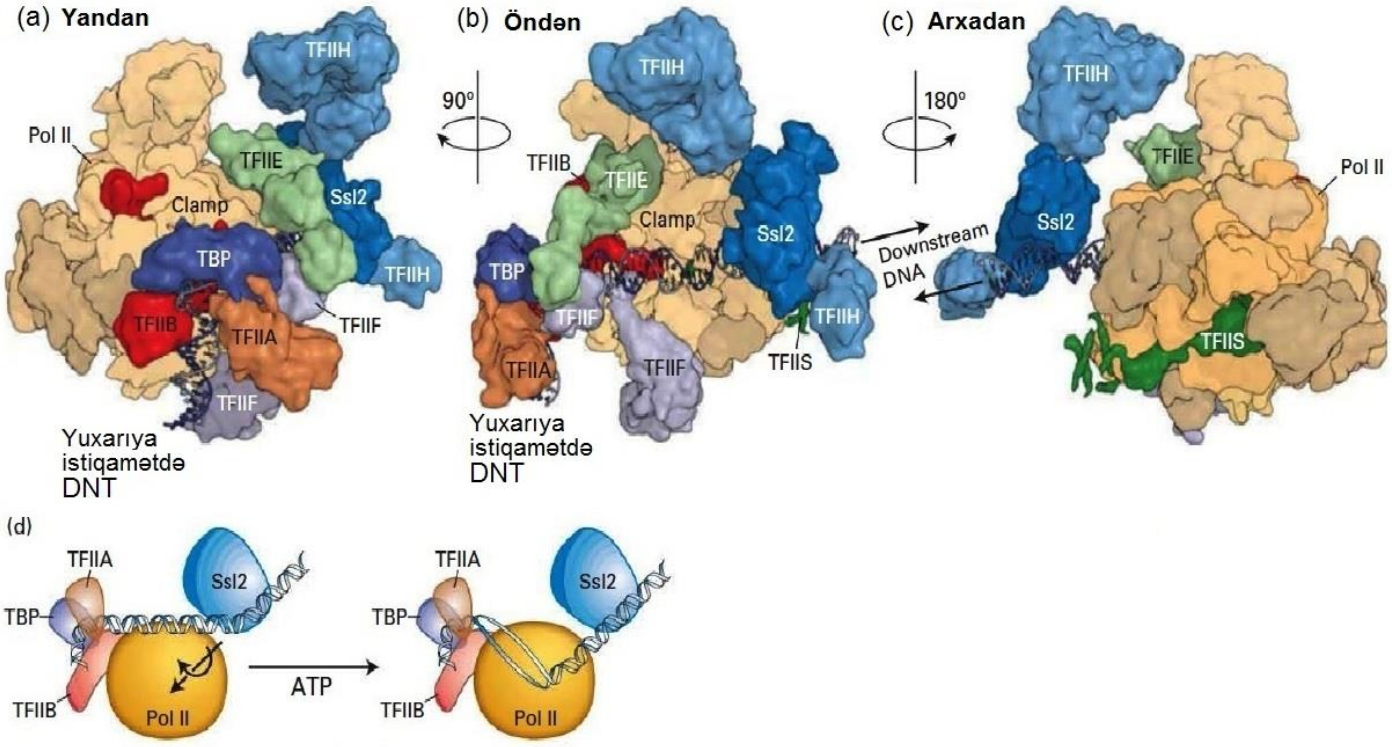
ŞƏKİL 9-19 RNT polimaraza II preinisiasiya kompleksinin ardıcıl in vitro yığılması modeli. Qeyd olunan əsas transkripsiya faktorları və təmizlənmiş RNT polimeraza II (Pol II) TATA boks DNT-yə ardıcıl birləşərək preinisiasiya kompleksini (PIC) yaradırlar. Sonra ATP-nin hidrolizi start saytında DNT-nin ikiqat zəncirinin TFIIH subvahidi ilə açmaq üçün tələb olunan enerjini təmin edir. DNT TFIID-nin TBP subvahidi vasitəsilə TATA boksa birləşməklə PIC-dəki mövqeyində saxlanılır, nəticədə dubleks DNT-nin quruluşunda əmələ gələn gərginlik (dartılma) TFIIB-nin N-sonluğuna və Pol II-yə transkripsiyanın start saytında DNT-ni əritməsinə və transkripsiya köpüyünü yaranmasına kömək edir. Nəticədə, əmələ gələn açıq kompleksdə Pol II transkripsiyanı inisiasiya edən kimi, polimeraza transkripsiya edərək promotordan uzaqlaşır, onun CTD-si TFIIH kinaza domeni vasitəsi ilə fosforlaşır və əsas transkripsiya faktorları promotor kompleksindən dissosasiya edirlər. Bax S. Sainsbury, C. Berrnecky and P. Cramer, 2015, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **16**:129.

və onun əsas transkripsiya faktorları transkripsiyanı inisiasiya etməyə hazır olurlar və *preinisiasiya kompleksi* adlanırlar. Şəkil 9-19 Pol II transkripsiyanın preinisiasiyası kompleksinin TATA boksa malik olan promotor üzərində pillə-pillə in vitro toplanmasını ümumiləşdirib göstərir.

TFIID-nin TBP subvahidi TATA boks promotora birləşən ilk zülaldır. Bu vaxta qədər analiz olunan bütün eukariot TBP-lər 180 qalıqdan ibarət olan çox oxşar C-sonluqlu domenə malikdirlər. TBP-nin bu domeni yəhərəbənzər quruluşda bükülür, molekulun iki yarısı ümumi qoşa simmetriyanı nümayiş etdirir, amma identik deyillər. TBP DNT-nin kiçik şırımı ilə əlaqəyə girir və spiralı əhəmiyyətli dərəcədə əyir (bax Şəkil 5-5). TBP-nin DNT birləşdirən səthi bütün eukariotlar üçün konservativdir, bu da TATA boks promoter elementinin yüksək dərəcədə qorunub saxlandığını göstərir (bax Şəkil 9-16).

TBP TATA boksa birləşən kimi, TFIIA və TFIIB birləşə bilirlər. TFIIA heterodimer zülaldır və TBP-dən böyükdür, TFIIB isə monomer zülaldır və TBP-dən bir az kiçikdir. TFIIA TBP ilə və TBP-TATA boks kompleksin yuxarıya istiqamətində olan DNT ilə assosasiya edir. TFIIB-nin C-sonluq domeni həm TBP həm də DNT ilə TATA boksun istənilən tərəfində əlaqəyə girir. Transkripsiyanın inisiasiyası müddətində, onun N-sonluq domeni RNT polimeraza II-nin RNT çıxış kanalına daxil olur (bax Şəkil 9-12c). TFIIB-nin N-sonluq domeni transkripsiyanın start saytında DNT zəncirlərini əritmək (ayırmaq) üçün Pol II-yə kömək edir və Pol II-in fəal mərkəzi yaxınlığında DNT-nin templeyt zənciri ilə əlaqəyə girir. TFIIB birləşməsinin ardınca əmələ gəlmiş TFIIF kompleksi (məməlilərdə iki müxtəlif subvahidin heterodimeri) və Pol II birləşirlər və polimerazanı start sayt üşərində yerləşdirirlər. Templeyt zənciri açıq vəziyyətə gətirmək üçün DNT-nin ikiqat zənciri ayrılmazdan öncə daha iki əsas transkripsiya faktorlarının birləşməsi lazımdır. Birinci birləşən, iki müxtəlif subvahidin heterodimeri TFIIE-dir. TFIIE, 10 müxtəlif subvahiddən təşkil olunmuş, digər multimer faktor olan TFIIH üçün dok (lövbər) mərkəzi yaradır. TFIIH-ın birləşməsi transkripsiyanın preinisiasiyası kompleksinin yığılmasını tamamlayır (Şəkil 9-19).

Şəkil 9-20-də mayada (*S. cerevisiae*) təmizlənmiş RNT polimeraza II-dən və əsas transkripsiya faktorlarından tam TFIID kompleksin yerinə TBP ilə in vitro toplanmış preinisiasiya kompleksinin krioelektron mikroskopu ilə alınan təsvirini verir, ümumilikdə 1.5 meqa dalton (MDa) molekulyar çəkiyə – ribosomal subvahidin çəkisinə bərabər olan otuz üç polipeptid iştirak edir. Bu cürə təkmilləşmiş preinisiasiya kompleksi eukariotlarda ekspressiya olunan bütün zülal-kodlaşdıran genlərin promotorlarında toplanır.



ŞƏKIL 9-20 Maya preinisiasiya kompleksinin krioelektron mikroskopuna əsaslanan və məlum olan zülalın rentgen-kristal quruluşuna uyğunlaşdırılan modeli. (a-c) Təxminən tamamlanmış vəziyyətdə olan PIC-nin üç görünüşü. Pol II və əksər GTF-lərin nisbi mövqeyi müşahidə olunmuşdur, amma TFIIH-ın yalnız 50% yaxını göstərilir, çünki TFIIH-ın böyük miqdarı çox çevikdir və müvafiq olaraq krio-EM ilə dəqiqliklə təyin oluna bilmir. Amma, Pol II yarığın aşağıya istiqamət tərəfində DNT ilə promotor DNT-nin əriməsi üçün tələb olunan TFIIH Ssl2 helikaza subvahidi arasında qarşılıqlı əlaqə (b) və (c)-də aydın şəkildə vizuallaşdırılır. (c)-də TFIIH və TFIIE arasında qarşılıqlı təsir bu rayonda kompleksin rezolyusiyası çox aşağı olduğundan vizuallaşdırılmır. TFIIS Pol II elonqasiya faktorudur, PIC-ni stabilləşdirmək üçün əlavə edilir. (d) Templeyt zəncirlərin RNT polimerləşməsinin kataliz olunduğu yarığın daxilinə girməsi modeli. Ssl2 helikaza yuxarı istiqamətdə TBP, TFIIB və TFIIA ilə birləşmiş DNT-ni itələyir, transkripsiya köpüyünün əriməsinə kömək edən torsional stresi yaradır.[Verilənlər K. Murakami, et al. 2015. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112:**13543,PDB ID 5fmf-dən.]

TFIIH-ın əsas subvahidlərindən birinin (mayada Ssl2, bax Şıkil 9-20d) **helikaza** fəallığı ATP-nin hidrolizindən alınan enerjidən istifadə edərək start saytında DNT dupleksinin açılmasına kömək edir, Pol II-nin *açıq* kompleksi yaratmasına imkan verir, bu zaman start saytına sarınan dupleks DNT əriyir və templeyt zəncir polimerazanın fəal mərkəzinə birləşir. RNT polimeraza transkripsiya edərək promotor rayonundan uzaqlaşdıqda, yeni sintez olunan RNT-nin 5′-sonluğu RNT çıxış kanalına daxil olan kimi TFIIB-nin N-sonluq domeni ondan buraxılır. Üç TFIIH subvahidlər kinaza modulunu (Şəkil 9-19-da TFIIH kinaza) əmələ gətirir, CTD əmələ gətirən Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser təkrarlarında Pol II CTD-ni serin 5 qalığından (altında xətt) dəfələrlə fosforlaşdırır. Fəsil 10-da bizim sonra müzakirə edəcəyimiz kimi, çoxsaylı fosforlaşmış CTD-lər RNT polimeraza II tərəfindən sintez olunan RNT-nin 5′ sonluğunda papaq quruluşu əmələ gətirən (bax Şəkil 5-14) fermentlər üçün dokinq (lövbər) saytı rolunu oynayırlar. TFIID və təmizlənmiş RNT polimeraz II-nin tam kompleksi üçün əvəz edilən TBP ilə in vitro minimal transkripsiya analizində, polimeraza transkripsiya edərək promotor rayonundan uzaqlaşdıqda TBP TATA boks ilə bağlı qalır, amma digər ümumi transkripsiya faktorları dissosasiya edirlər.

TFIIH-ın insandan klonlaşdırılan identifikasiya olunmuş ilk subvahidləri, son dərəcə maraqlıdır, çünki onlardakı mutasiyalar əsaslarla kovalent əlaqəli mutagenlər və ya UB-ilə-induksiya olunan timin-timin dimerlər kimi zədələnmiş DNT-nin bərpasında qüsurlara səbəb olur (bax Şəkil 5-37). Normal fərdlərdə, RNT polimeraza transkripsiya edərkən zədələnmiş templeyt DNT rayonunda dayandırılır, TFIIH-ın bir neçə subvahidindən, o cümlədən yuxarıda qeyd olunan helikaza subvahidindən ibarət olan sub-kompleks dayandırılmış polimerazanı tanıyır və sonra, TFIIH ilə birlikdə fəaliyyət göstərərək zədələnmiş DNT rayonunu bərpa edən digər zülallarla assosasiya edir. TFIIH-ın bu subvahidinin mutant forması olan xəstələrdə zədələnmiş DNT-nin bu cürə bərpası transkripsiyaya görə fəal genlərdə pozulmuş olur. Nəticədə, belə xəstə şəxslər günəş işığına qarşı həddən artıq həssas dəriyə malik olurlar (DNT-nin ümumi zədələnməsi əsasən ultrabənövşəyi şüalarla olur) və çox yüksək xərçəng xəstəliyinə tutulma ehtimalları olur. Nəticə etibarı ilə, TFIIH-ın bu subvahidləri hüceyrədə iki funksiyamı həyata keçirir, biri transkripsiyanın inisiasiyası prosesindəki rolu, ikinci funksiyası isə DNT-nin bərpasında roludur. TFIIH-ın funksiyasında zədələnmənin sərtliyindən asılı olaraq bu fərdlər kseroderma piqmentozum Kokayne sindromu xəstəliklərindən əziyyət çəkə bilirlər (bax Fəsil 5).

TFIID-nin TAF subvahidi transkripsiyanın TATA boksu olmayan promotordan inisiasiyasında fəaliyyət göstərir. Məsələn, bəzi TAF subvahidləri, promotorlarda inisiator elementi olduqda onunla əlaqədə olurlar, bu da həmin ardıcıllıqların TATA boksu necə əvəz etdiklərini izah edir (bax Şəkil 9-16). Əlavə TFIID TAF subvahidlər, TATA boks promotor olmayan çoxsaylı genlərdə transkripsiyanın start saytından təxminən 30 əsas cütü aşağıya doğru ortasında A/G-G-A/T-C/T-G/A/C olan konsensus ardıcıllığa, birləşə bilirlər. Yerləşmə vəziyyətinə görə, bu tənzimləyici ardıcıllıq *aşağıya doğru promotor elementi* (*downstream promoter element – DPE*) kimi adlandırılır (bax Şəkil 9-16). DPE TATA-sız genlərdə TFIID birləşməsini artırmaqla transkripsiyaya imkan yaradır. Bundan əlavə, TFIIB-nin α-spiralı, TATA-boksdan yuxarıya doğru DNT-nin böyük şırımına birləşir və daha güclü olan promotorlar bu qarşılıqlı təsir üçün, *TFIIB tanıyan element* (*TFIIB recognition element – BRE*) adlanan optimal ardıcıllığa malik olurlar (bax Şəkil 9-16).

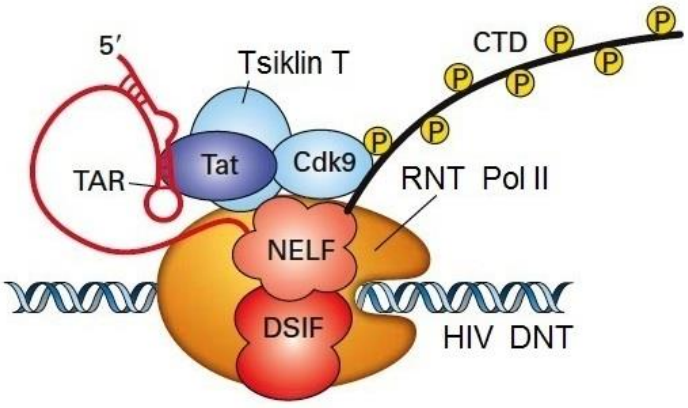
TBP-yə spesifik anticismlərdən istifadə edərək aparılmış xromatin immunçökdürmə sınaqları (bax Şəkil 9-18) göstərdi ki, o divergent transkripsiya saytları arasındakı rayonda CpG ada promotorlara birləşir. Uyğun olaraq, transkripsiyanın zəif CpG ada prromotorlardan başlanması üçün, demək olar ki, TATA boksa malik olan promotorlarda olduğu kimi, eyni əsas transkripsiya faktorları tələb olunurlar. Preinisiasiya kompleksinin düzgün yönəlməsi üçün DNT ardıcıllığından siqnal olmadığına görə, Şəkil 9-16-də ümumiləşdirilərək göstərilmiş promotor elementlərinin olmaması, CpG ada promotorlarda müşahidə olunan çoxsaylı transkripsiya start saytından divergent transkripsiyanı izah edilə bilər. TFIID və başqa əsas transkripsiya faktorları CpG ada promotorlarda alternativ, təxminən ekvivalent zəif birləşmə saytları arasından birini seçə bilir, bununla da transkripsiyanın inisiasiyasının aşağı tezliyini və eləcə də, xüsusən bu sinif promotorlarda müşahidə olunan, divergent istiqamətlərdə alternativ transkripsiya start saytlarını potensial izah edir.

Elonqasiya Faktorları Promotora-Yaxın Rayonda Transkripsiyanın İlkin Mərhələlərini Tənzimləyir

Metazoanlarda promotorların əksəriyyətində, Pol II təxminən 100 nukleotidə yaxın transkripsiya etdikdən sonra, ona beş-subvahidli NELF (*negativ elongation faktor*) zülalı birləşdiyindən aram verib dayanır. Bunun ardınca, DSIF (*DRB-sensitive-indusing factor*) adlanan iki-subvahidli elonqasiya faktoru ilə yanaşı NELF Pol II ilə birləşir (bu ona görə belə adlandırılır ki, ATP-nin DRB adlanan analoqu mövcud olduğu zaman transkripsiyanın elonqasiyasını ingibirləşdirir). NELF-in Pol II ilə birləşməsi nəticəsində elonqasiyanın ingibirləşməsi, DSIF, NELF və Pol II CTD təkrarın (Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser) serin 2 qalığı Pol II-DSIF-NELF kompleksi ilə assosasiyada oaln və *P-TEF*b kimi adlanan iki-subvahidli proteinkinaza tsiklin T-CDK9 ilə fosforlaşanda buraxılır. Eyni elonqasiya faktorları CpG ada promotorlardan başlanan transkripsoyanın elonqasiyasını tənzimləyir. Elonqasiyanı promotora-yaxın rayondan tənzimləyən bu faktorlar, transkripsiyanın inisiasiyasının tənzimlənməsi ilə yanaşı genlərin transkripsiyasının əlavə nəzarət mexanizmini təmin edir. Transkripsiyanın promotora-yaxın rayonda həm inisiasiya həm də elonqasiya mərhələləri zamanı tənzimlənməsinin belə ümumi strategiyası *E. coli*-də *Trp* operonun tənzimlənməsinə (Şəkil 9-7) bənzəyir, hərçənd ki, bunlara aid olan molekulyar mexanizmlər fərqlidir.

QİÇS-a səbəb olan HIV-in (human immunodeficiency virus) transkripsiyası, **Tat** adlanan kiçik virus zülalı vasitəsilə T-CDK9-un fəallaşmasından asılıdır. *tat*$^-$ mutantlarla yoluxmuş hüceyrələr təxminən 50 nukleotid uzunluqda qısa virus transkriptini istehsal edirlər. Əksinə, təbii-formalı HIV-lə

yoluxan hüceyrələr, bütün virus genomu boyu uzanan uzun provirus transkriptlərini istehsal edirlər (bax Şəkil 5-48 və Şəkil 8-13). Beləliklə, Tat *antiterminasiya faktoru* kimi fəaliyyət göstərərək RNT polimeraza II-nin bütün transkripsiya blokunu oxumasına imkan verir. (HIV promoter ağ qan hüceyrələrinin bir tipi olan "fəallaşmış" T limfositlərdə yüksək səviyyədə transkripsiya edən zaman, ilkin olaraq Tat terminasiya edə bilməyən nadir transkriptlər tərəfindən hazırlanır, bax Fəsil 23). Tat ardıcıllıq-spesifik RNT birləşdirən zülaldır. O, TAR adlanan ardıcıllığın RNT nüsxəsinə birləşir və HIV transkriptin 5′ sonluğuna yaxın sütun-ilgək quruluşunu əmələ gətirir (Şəkil 9-21). TAR həmçinin tsiklin T-yə birləşir və CDK9-tsiklin T kompleksini polimerazaya yaxın saxlayır, burada CDK9-tsiklin T öz substratlarını səmərəli şəkildə fosforlaşdıraraq transkripsiyanın elonqasiyasına səbəb olur. Hüceyrələrə CDK9-un xüsusi ingibitoru ilə təsir etdikdən sonra aparılmış immunçökdürmə sınağı göstərdi ki, məməlilərin genlərinin təxminən 30 faizinin transkripsiyası CDK9-tsiklin T-ə (P-TEFb) nəzarət olunmaqla tənzimlənir, hərçənd ki, böyük ehtimalla bu çox hallarda, HIV Tat zülallarda olduğu kimi RNT-birləşdirən zülallarla deyil, ardıcıllıq-spesifik DNT birləışdirən transkripsiya faktorları ilə baş verir.



ŞƏKİL 9-21 HIV Tat zülaldan və bir sıra hüceyrə zülallarından təşkil olunmuş antiterminasiya kompleksinin modeli. HIV transkriptin TAR elementi Tat tərəfindən və hüceyrənin tsiklin T zülalı tərəfindən tanınan ardıcıllığa malikdir. Tsiklin-T CDK9 proteinkinazanı fəallaşdırır və onun substratları RNT polimeraza II-nin CTD, NELF və DSIF yaxınlığında yerləşməsinə kömək edir. Pol II CTD heptad təkrarların serin 2 qalığında CTD-nin fosforlaşması transkripsiyanın elonqasiyası üçün tələb olunur. Hüceyrə zülalı DSIF (həmçinin Spt4/5 adlanır) və NELF kompleksi də, tekstdə müzakirə olunduğu kimi, Pol II-ilə elonqasiyanın tənzimlənməsində iştirak edir. Bax T. Wada et al., 1998, *Genes Dev*. **12**:357; Y. Yamaguchi et al., 1999, *Cell*, **97**:451; və T. Yamada et al., 2006, *Mol. Cell* **21**:227.

9.3 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSİYALARI

RNT Polimeraza II Promotorlar və Əsas Transkripsiya Faktorları

- RNT polimeraza II genlərin transkripsiyasını, kodlaşdırılan mRNT molekulunda papaq əmələ gətirən 5′ nukleotidə uyğun olan templeyt DNT-dəki nukleotidlərdə inisiasiya edir.
- Eukariotik DNT-də üç əsas tip promotor ardıcıllıqları identifikasiya edilmişdir. TATA boks yüksək dərəcədə transkripsiya olunan genlərdə geniş yayılmışdır. İnisiator promotorlar bəzi genlərdə tapılmışdır, və onurğalılarda təxminən 70 faizə qədər zülal kodlaşdıran genlərin promotoru CpG adalar aşağı dərəcədə transkribsiya olunan genlər üçün xarakterikdir.
- Zülal-kodlaşdıran genlərin Pol II ilə transkripsiyası aşağıdakıların göstərilmiş ardıcıllıqla birləşməsi ilə in vitro inisiasiya oluna bilər: TATA-boks DNT-yə birləşən TBP subvahidə malik olan TFIID, TFIIA və TFIIB, Pol II ilə TFIIF-in kompleksi, TFIIE, nəhayət TFIIH (bax Şəkil 9-19).
- TFIIH-ın subvahidinin helikaza fəallığı promotorların çoxunda start saytında DNT zəncirlərini ayırmağa kömək edir, bu prosesdə ATP hidrolizi tələb olunur. Pol II transkripsiya edərək start saytdan uzaqlaşmağa başlayan kimi, onun CTD domeni serin 5 qalığında TFIIH kinaza domeni ilə fosforlaşır.
- Metazoanlarda, NELF və DSIF inisasiyadan sonra Pol II ilə assosasiya edirlər, transkripsiyanın elonqasiyasını start saytından təxminən 100-ə yaxın əsasdan sonra ingibirləşdirirlər. Tsiklin T-CDK9 (həmçinin P-TEFb kmi adlanan) elonqasiya kompleksi ilə birləşəndə və CDK9 NELF-in subvahidini, DSIF və Pol II CTD-nin serin 2 qalığını fosforlaşdıranda elonqasiyanın ingibirləşməsi buraxılır.

9.4 Zülal-kodlaşdıran Genlərin Tənzimləyici Ardıcıllıqları və Onların Fəaliyyət Göstərdiyi Zülallar

Əvvəlki bölmədə qeyd olunduğu kimi, eukariot zülal-kodlaşdıran genlərin ekspressiyası, ümumən *transkripsiya-nəzarət rayonları* adlanan çoxsaylı zülal birləşdirən DNT ardıcıllıqları vasitəsi ilə tənzimlənir. Bunlara promotorlar və transkripsiyanın start saytına yaxın yerləşən başqa tip nəzarət elementləri və eləcə də, tənzimlədikləri gendən çox uzaqda yerləşən ardıcıllıqlar daxildirlər. Bu bölmədə, biz eukariotların zülal-kodlaşdıran genlərində tapılmış müxtəlif nəzarət elementlərinin və onlara birləşən zülalların xassələrinə daha yaxından baxacağıq.

Promotora-Yaxın Elementlər Eukariot Genlərini Tənzimləməyə Kömək Edir

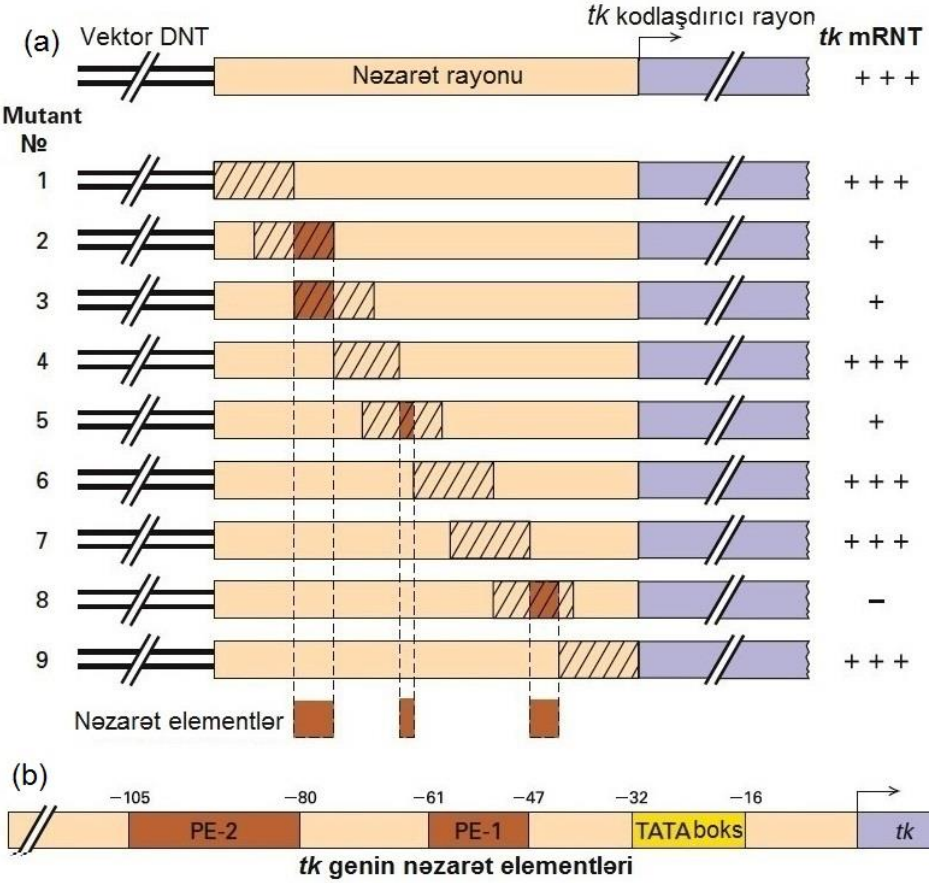
Transkripsiya-nəzarət rayonlarını müyyənləşdirmək üçün müxtəlif eukariot genlərin nukleotid ardıcıllıqlarını mütamadi olaraq mutasiya etmək üçün rekombinant DNT metodları istifadə edilmişdir. Məsələn, *linkerlə skan olunan mutasiya* tənzimləyici rayon daxilindəki transkripsiyaya nəzarət kimi fəaliyyət göstərən ardıcıllıqların yerini müəyyənləşdirə bilir. Bu yanaşmada, bitişik üst-üstə düşən mutasiyalarla bir sıra konstruktlar reportyor genin ekspressiyasına və ya spesifik mRNT istehsalına təsirinin öyrənilməsi məqsədi ilə

yoxlanılmışdır (Şəkil 9-22a). Bu tipli analizlər, herpes simpleks I tip virusunda (HSV-I) timidin kinaza (*tk*) geninin **promotora-axın elementlərini** identifikasiya etdi. Nəticələr göstərdi ki, HSV *tk* gendən yuxarıya olan DNT rayonu üç ayrı transkripsiya-nəzarət ardıcıllıqlarına malikdir: –32-dən –16 qədər intervalda TATA boks və iki başqa nəzarət elementləri daha uzaq yuxarıya istiqamətdə yerləşir (Şəkil 9-22b). Promotor-proksimal nəzarət elementlərində tək-əsas-cütü dəyişilməsinə malik olan mutasiyalardan istifadə etməklə aparılan təcrübələr aşkar etdi ki, onlar əsasən təxminən 6-10 əsas cütü uzunluqdadırlar. Son zamanların təcrübələri göstərdi ki, onlar insan genlərində transkripsiyanın start saytından həm yuxarıya, həm də aşağıya istiqamətdə bərabər tezlikdə tapılırlar. Ciddi desək, *promotor* sözü polimerazanın transkripsiyanı inisiasiya edəcəyi DNT ardıcıllığına aid edilir, bu söz tez-tez hallarda həm promotor həm də onunla assosasiyada olan promotor-proksimal (promotora yaxın) nəzarət elementlərinə aid edilir.

Linker-skaninq mutasiyaların analizi ilə identifikasiya olunmuş HSV-I *tk* promotor rayonunda nəzarət elementlərində məhdudiyyətlər arası məsafəni yoxlamaq üçün, tədqiqatçılar elementlər arasında kiçik delesiyalara və insersiyalara malik olan konstruktları hazırlayaraq yoxladılar. Promotor və promotora-proksimal nəzarət elementləri arasında 20 nukleotid və ya daha az məsafədə dəyişilmələr kiçik təsirə malik olmuşdur. Amma, HSV-I *tk* promotora-proksimal elementlərlə TATA boks arasında 30-50 əsas cütü insersiyalar elementlərin silinməsinə ekvivalent olmuşdur. Başqa eukariot promotorların oxşar analizi də həmçinin göstərmişdir ki, promotor-proksimal elementlər arasındakı məsafədə kifayət qədər elastiklik bir qayda olaraq dözümlü olmuşdur, amma bir neçə on əsas cütünün ayrılması transkripsiyanı azalda bilir.

Uzaq Enhanserlər Çox Hallarda Traskripsiyanı RNT Polimeraza II ilə Stimullaşdırır

Əvvəldə qeyd olunduğu kimi, çox eukariotik promotorlardan başlanan transkripsiya start saytından minlərlə əsas cütü kənarda yerləşən nəzarət elementləri tərəfindən tənzimlənə bilir. Bütün eukariotik genom üçün ümumi olan, amma bakteriyalarda tamamilə az rast gəlinən belə çox-uzaq transkripsiya-nəzarət elementləri enhanserlər adlanır. Linker skaninq mutagenez kimi proseslər göstərdi ki, adətən 200 əsas cütünə yaxın ölçüdə olan enhanserlər, promotor-proksimal elementlər kimi təxminən bir neçə 6-10 əsas cütü ölçüdə olan funksional ardıcıllıq elementlərindən təşkil olunmuşlar. Daha sonra müzakirə edildiyi kimi, bu tənzimləyici elementlərin hər biri ardıcıllıq-spesifik DNT-birləşdirən transkripsiya faktorları üçün birləşmə saytlarıdırlar.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 9-22 Linker skaninq mutasiyalar trankripsiya-nəzarət elementlərini təyin edir. (a) Yuxarıdakı diaqramda göstərildiyi kimi, reportyor genin (açıq bənövşəyi) yüksək səviyyədə ekspressiyasını təmin edən eukariot DNT rayonu (sarı-şabalıdı) plazmid vektora klonlaşdırıldı. Üst-üstə düşən linker skaninq (LS) mutasiyalar (çarpaz ştrixlənmiş) rayonun bir tərəfindən daxil edilmiş və digər ucundan analiz olunmağa başlanmışdır. Bu mutasiyalar nukleotid ardıcıllıqlarının qısa DNT uzunluğunda tez şəkildə qarışdırmaqla (scrambling) aradılmışdır. Mutant plazmidlər ayrıca kultura olunmuş hüceyrələrə keçirildikdən sonra reportyor gen məhsulunun fəallığı yoxlanıldı. Burada göstərilən nümunədə, herpes simpleks virusun timidin kinaza genində –120-dən +1 qədər ardıcıllıqda 1, 4, 6, 7 və 9 LS mutasiyalar reportyor genin ekspressiyasına çox az təsir etmişdir və ya heç etməmişdir, bu göstərir ki, bu mutantlarda dəyişilmiş rayonlar nəzarət elementlərinə malik deyillər. Reportyor genlərin ekspressiyası 2, 3, 5 və 8-ci mutantlarda əhəmiyyətli dərəcədə azalmışdır, bu da, nəzarət elementlərinin (qonur) aşağıda göstərilən intervalda yerləşdiyini bildirir. (b) Bu LS mutasiyaların analizi TATA boksu və iki promotor-proksimal elementləri (PE-1 və PE-2) aşkar etdi. Bax S.L. McKnight and R. Kingsbury, 1982, Science, 217:316.

Çoxsaylı müxtəlif metazoanlarda eukariot hüceyrə enhanserlərinin analizi göstərmişdir ki, onlar intron daxilində bərabər ehtimalla promotordan yuxarıya və promotordan aşağıya və ya *SALL*1 genində olduğu kimi, hətta genin axırıncı eqzonundan da aşağı ola bilirlər (bax Şəkil 9-10a). Çox enhanserlər hüceyrə-tipi spesifik olurlar. Məsələn, torlu qişada *Pax*6 genin ekspressiyasına nəzartət edən enhanser 4 və 5-ci eqzonlar arasında olan intronda yerləşməsi ilə xarakterizə olunduğu halda (bax Şəkil 9-9a), hormon ifraz edən mədəaltı hüceyrələrdəki *Pax*6 geninə nəzarət edən enhanser eqzon 0-dan (ona görə belə "0" adlandırılır ki, o "eqzon 1"-dən sonra aşkar olunmuşdur) təxminən 200 əsas cütü yuxarıya istiqamətdəki rayonda yerləşir.

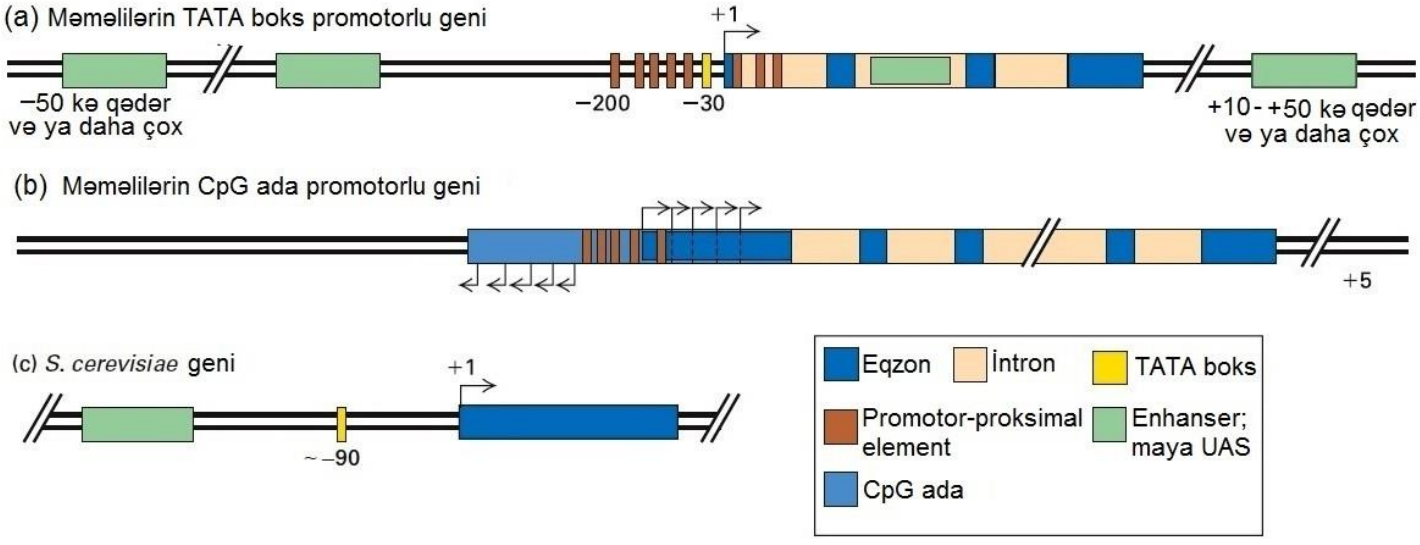
Eukariot Genlərin Əksəriyyəti Çoxsaylı Transkripsiya-Nəzarət Elementləri ilə Tənzimlənir

Əvvəllər güman olunurdu ki, enhanserlər və promoter-proksimal elementlər müxtəlif tipli transkripsiya-nəzarət elementləridirlər. Amma, daha çox enhanser və promoter-proksimal elementləri analiz olunduqca onların arasındakı fərqlər daha az aydın oldu. Məsələn, hər iki tip element hətta çevrilmiş vəziyyətdə olsa da belə, bir qayda olaraq transkripsiyanı stimullaşdıra bilirlər və hər iki tip çox hallarda hüceyrə-tipi spesifik olurlar. İndi ümumi konsensus ondan ibarətdir ki, nəzarət elementlərinin spektri RNT polimeraza II ilə transkripsiyanı tənzimləyir. Bir müstəsnalıq enhanserlərin transkripsiyanı minlərlə əsas cütü uzaqda olan promotorlardan stimullaşdıra bilməsidir. Digər müstəsnalıq promotor-proksimal elementlərdir, məsələn HSV-I *tk* geninə nəzarət edən yuxarıya istiqamətdə yerləşən elementlər promotordan əlavə olaraq 30-50 əsas cütü daha da uzağa köçürüləndə öz təsirlərini itirirlər. Tədqiqatçılar, transkripsiyanı bu iki müstəsnalıqlar arasındakı məsafədən stimullaşdıra bilən böyük sayda transkripsiya-nəzarət elementlərini identifikasiya etdilər.

Şəkil 9-23a məməlilərin ehtimal olunan TATA boksa malik olan genləri üçün transkripsiya nəzarət ardıcıllıqlarının yerlərini ümumiləşdirilmuiş şəkildə verir. Transkripsiyanın start saytı mRNT-nin birinci eqzonunun ilk (5′) nukleotidini, papağı əmələ gətirən nukleotidi kodlaşdırır. TATA boksdan əlavə, təxminən –31-dən –26-ya qədər olan, nisbətən qısa (~6-10 əsas cütü) uzunluqlu promotor-proksimal elementlər start saytdan ya yuxarıya istiqamətdə ya da aşağıya istiqamətdə ilk 200 əsas cütü daxilində yerləşirlər. Əksinə, enhanserlər bir qayda olaraq 50-200 əc qədər uzunluqda olub 6-10 əc uzunluqda çoxsaylı elementlərdən təşkil olunur. Ola bilər ki, enhanserlər start saytından 50 kə yuxarıya istiqamətdə və ya aşağıya istiqamətdə, ya da intron daxilində yerləşsinlər. *Pax*6 genində olduğu kimi, məməlilərin çox genləri, müxtəlif hüceyrə tiplərində fəaliyyət göstərən çoxsaylı enhanser rayonu ilə nəzarət olunurlar.

Şəkil 9-23b məməlilərin CpG ada promotoruna malik olan genlərində promotor rayonlarını ümumiləşdirərək verir. Məməlilərin təxminən 70 faizə qədər genləri CpG ada promotorlardan ekspressiya olunurlar, bunların ekspressiya dərəcəsi adətən TATA-boks promotorlara malik olan genlərdən çox aşağı səviyyədə olur. Start saytdan alınan hər bir birinci eqzonda alternativ 5′ sonluğa malik olan mRNT-ləri yaratmaq üçün çoxsaylı alternativ transkripsiya start saytları istifadə olunurlar. Transkripsiya hər iki istiqamətdə baş verir, amma transkripsiya edən Pol II molekulları sens istiqamətində antisens istiqamətin transkriptlərinə nisbətən səmərəli şəkildə 1 kə qədər və ya daha çox elonqasiya edir.

Çox əhəmiyyətli model orqanizm olan *Saccharomycses cerevisiae*-də (tumurcuqlayan maya) genlər daha sıx yerləşirlər (bax Şəkil 8-4b) və çox az genlərdə intron olur. Bu orqanizmdə **yuxarıya istiqamətdə fəallaşdırıcı ardıcıllıq (upstream activating sequence – UAS)** hesab edilən enhanserlər tənzimlədikləri genin promotorundan təxminən 200 əsas cütü yuxarıya istiqamətdə yerləşirlər. Maya genlərinin əksəriyyəti yalnız bir bir UAS-ə malik olurlar. Bundan başqa, *S. cerevisiae* genləri, transkripsiyanın start saytından təxminən 90 əsas cütü yuxarıya istiqamətdə TATA boksa malik olurlar (Şəkil 9-23c).

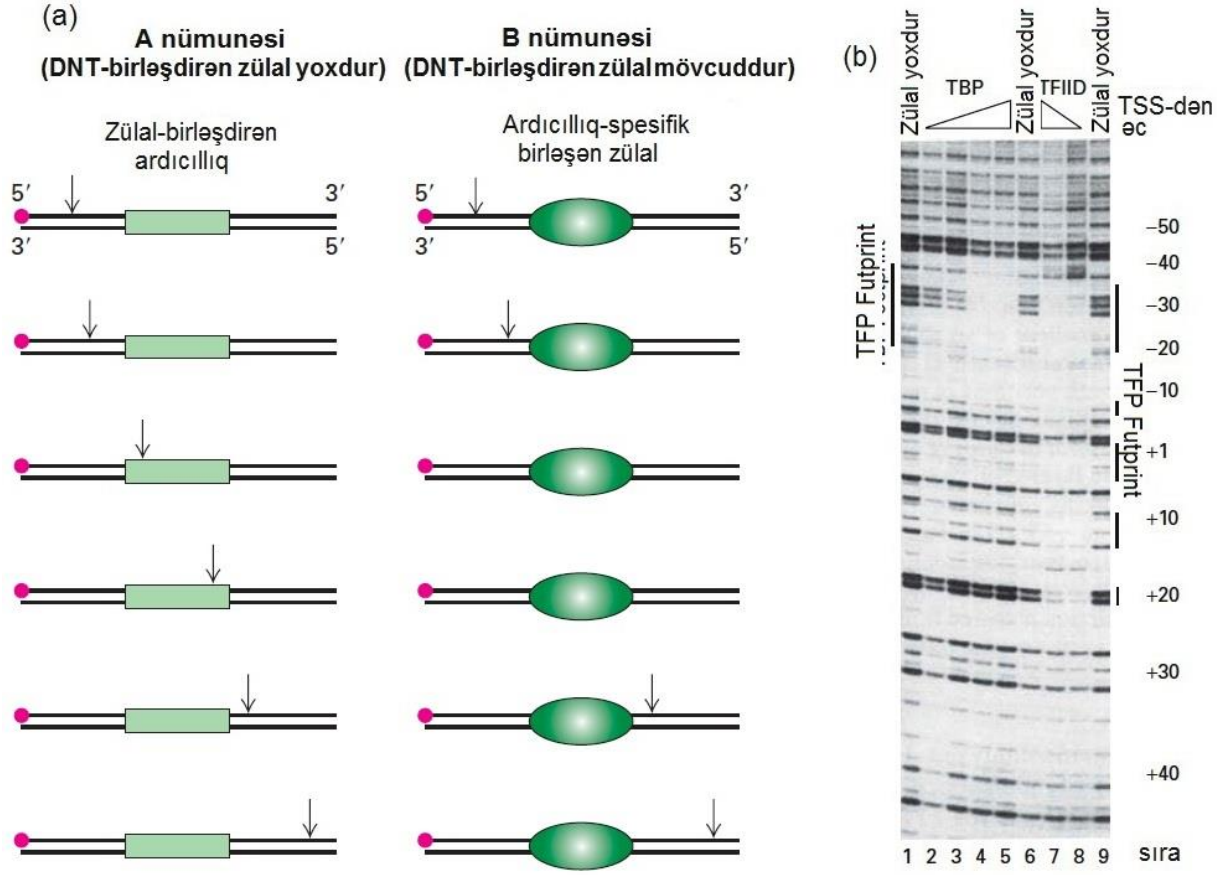


Şəkil 9-23 Çoxhüceyrəli eukariotlarda və mayada genlərin ekspressiyasını tənzimləyən nəzarət elementlərinin ümumi təşkili. (a) Məməlilərin TATA-boks promotorlu genləri promotor-proksimal elementlərlə və enhanserlərlə tənzimlənir. Şəkil 9-16-da göstərilən promotor elementləri transkripsiyanı start saytında inisiasiya etmək üçün RNT polimeraza II-nin yerini müəyyən edirlər və transkripsiyanın gedişinə təsir edirlər. Enhanserlər yuxarıya istiqamətə və ya aşağıya istiqamətdə və transkripsiyanın start saytından yüzlərlə kilo əsas uzaqda yerləşə bilirlər. Bəzi hallarda, enhanserlər intronlar daxilində yerləşirlər. Promoter-proksimal elementlər məməlilərin genlərində transkripsiyanın start saytından yuxarıya və aşağıya istiqamətdə eyni tezlikdə yerləşə bilirlər. (b) Məməlilərin CpG-ada promotorları olan genlər üçün transkripsiya bir neçə saytda CpG-zəngin rayonların ucundan həm sens, həm də antisens istiqamətdə inisiasiya olunurlar. Sens istiqamətdə transkript elonqasiya edərək RNT splaysing yolu ilə mRNT-yə prosess olunur. Onlar mRNT-ni transkripsiyanın start saytı ilə müəyyən olunmuş alternativ 5′ eqzonlarla ekspressiya edirlər. CpG-ada promotorlar promotor-proksimal nəzarət elementlərinə malikdirlər. Hal-hazırda onların uzaq enhanserlərlə tənzimlənmələri hələ aydın deyil. (c) *S. cerevisiae* genlərinin çoxu yalnız bir, *yuxarıya istiqamətdə fəallaşdırıcı ardıcıllıq* (*upstream activating sequence – UAS*) adlanan tənzimləyici rayona və start saytdan 90 əsas cütünə yaxın yuxarıya istiqamətdə yerləşmiş TATA boksa malikdir.

DN-aza I Futprintinqi və EMSA Zülal-DNT-Əlaqələrini Aşkar Edir

Eukariot DNT-sində tapılmış müxtəlif transkripsiya-nəzarət elementləri, ümumilikdə ***transkripsiya faktorları*** adlanan təzimləyici zülallar üçün birləşmə saytlarıdır. Ən sadə eukariot hüceyrə yüzlərlə transkripsiya faktorlarını kodlaşdırır, insan genomu isə ən azı 1400 transkripsiya faktorunu kodlaşdırır. Genomda hər bir genin transkripsiyası transkripsiya nəzarət rayonuna birləşən *spesifik transkripsiya faktorları*nın kombinasiyası ilə müstəqil tənzimlənir. Bu qədər çoxsaylı transkripsiya faktorlarının mümkün olan kombinasiyalarının sayı, genomda kodlaşdırılan hər bir gen üçün unikal nəzarəti yaratmağa kifayət edən astronomik sayda olur.

Mayada, *Drosophila*-da və genetik cəhətdən izlənilə bilən digər eukariotlarda transkripsiya aktivatorlarını və repressorlarını kodlaşdıran çoxsaylı genlər, Fəsil 6-da təsviri verilmiş klassik genetik analizlərlə identifikasiya olunmuşdur. Amma, məməlilərdə və belə genetik analizlərə az uyğunlaşan başqa onurğalılarda, əvvəlcə transkripsiya faktorlarının əksəriyyəti aşkar olunmuş və sonra onlar biokimyəvi metodlarla təmizlənmişdir. Belə yanaşmada, yuxarıda təsvir olunduğu kimi, mutasiya analizləri ilə identifikasiya olunan DNT tənzimləyici elementi spesifik olaraq ona birləşən *qohum* zülalları identifikasiya etmək üçün istifadə olunur. Belə qohum zülalları aşkar etmək üçün istifadə olunan iki ümumi metod DN-aza I futprintinq və elektroforetik mobilliyin yerinidəyişmə testləridir

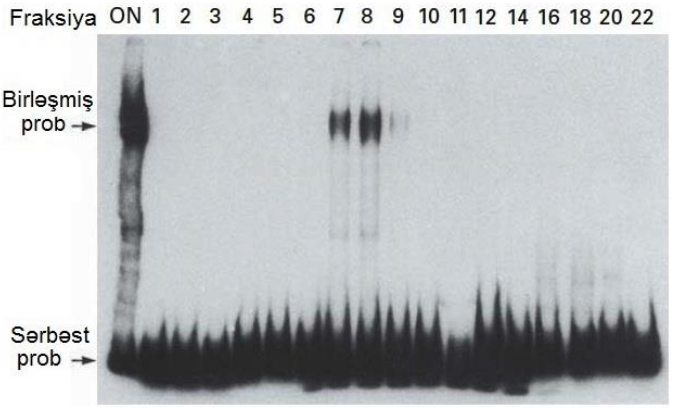


EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 9-24 DN-aza I futprintinq transkripsiya faktorunun birləşdiyi DNT ardıcıllığını aşkar edir. (a) Nəzarət elementinə malik olduğu məlum olan DNT fraqmenti bir ucunda ^{32}P (qırmızı nöqtələr) ilə nişanlandı. Nişanlanmış DNT nümunəsinin hissələri sonra, tərkibində ardıcıllıq spesifik DNT-birləşdirən zülalların olduğu zülal nümunələrinin iştirakı ilə və iştirakı olmadan DN-aza I vasitəsi ilə doğrandı. DN-aza I DNT-də bir nukleotidin dezoksiribozasındakı 3′ oksigenlə növbəti nukleotidin 5′ fosfatı arasındakı fosfodiefir əlaqələrini hidroliz edir. DN-aza I aşağı qatılıqda elə istifadə olunur ki, orta hesabla hər bir DNT molekulu yalnız bir dəfə kəsilir (şaquli oxlar). Əgər zülal nümunəsi spesifik ardıcıllığa malik olan DNT-birləşdirən zülala malik deyilsə DNT nümunəsi, A nümunəsində olduğu kimi (*solda*), orjinal farqmentin nişanlanmış və nişanlanmamış ucları arasındakı çoxsaylı müxtəlif hissələrdən kəsilir. Əgər zülal nümunəsi, B nümunəsində olduğu kimi (*sağda*), belə zülala malikdirsə, zülal DNT-də ona doğma olan ardıcıllığa birləşir, və bunula da fraqmentin bu hissəsini parçalanmaqdan mühafizə edir. DN-aza ilə təsir etdikdən sonra, DNT zülaldan ayrılır, zəncirləri ayırmaq üçün denaturasiya edilir və ardınca da elektroforez olunur. Alınan gelin radioavtoqrafiyası yalnız nişanlanmış zəncirləri aşkar edir və nişanlanmış ucdan DN-aza I ilə parçalanma saytına qədər olan fraqmentlıəri tapır. Nəzarət ardıcıllığına malik olan parçalanma fraqmentləri A nümunəsi üçün geldə göstərilmişdir, amma B nümunəsi üçün bu yoxdur, çünki birləşmiş doğma zülal ardıcıllığı daxilində parçalanmanın qarşısını alır və beləliklə müvafiq fraqmentlərin yaranmasına mane olur. Geldə çatmayan bəndlər futprinti (ləpiri) təşkil edir. (b) Güclü adenovirus gecikən promotorda TBP-nin (üçbucaqla göstərilmişdir) və TFIID-nin miqdarının artması ilə yaranan futprintlər. [(b) hissəsi Zhou, Q. et al., "Holo-TFIID supports transcriptional stimulation by diverse activators and from a TATA-less promoter," *Genes & Development*, 11/1992; **6**(10):1964–74-dən, Cold Spring Harbor Laboratory Press razılığı ilə yenidən çap olunur.]

Zülallar DNT rayonlarına birləşdiyi halda DN-aza I futprintinq çox istifadə olunur, birləşən zülal DNT-ni nukleazalarla doğranmaqdan mühafizə edir. Şəkil 9-24a-da göstərildiyi kimi, zəncirinin bir ucunda radioaktiv atomla nişanlanmış DNT fraqmenti DNT-birləşdirən zülalların iştirakı olan və olmayan vəziyyətdə diqqətlə nəzarət olunan şəraitdə doğranır, sonra denaturasiya olunaraq elektroforez olunur, və alınmış gel avtoradioqrafiyaya məruz qoyulur. Zülallarla birləşmiş mühafizə olunan rayon, zülallar olmayan halda doğranmış hissənin bəndlərinin düzülüşü arasında boşluq kimi və ya "ayaq ləpiri" ("futprint") kimi meydana çıxır. Footprintinq məlum DNT-nəzarət elementlərinə malik olan DNT fraqmentləri ilə aparılanda futprintinqin meydana çıxması, yoxlanılan bu nəzarət elementinə birləşmiş transkripsiya faktorunun mövcud olduğunu göstərir. Futprintinq həmçinin transkripsiya faktorlarının birləşdiyi xüsusi DNT ardıcıllığını identifikasiya edir.

Məsələn, güclü adenovirus gecikən promotorun DN-aza futprintinqində, nişanlanmış DNT-yə DN-aza I ilə doğranmadan öncə TBP əlavə olunanda TATA boks üzərindəki mühafizə olunan rayonu aşkar edir (Şəkil 9-24b). DN-aza I ikiqat zəncirli DNT-də bütün fosfodiefir rabitələrini bərabər sürətlə doğramır. Bunun nəticəsində əlavə olunmuş zülalların olmaması (1, 6 və 9 sıralar), DNT ardıcıllığından asılı olan və bəzi fosfodiefir əlaqələrinin parçalanmasının, başqalarının isə parçalanmamasının nəticəsi olan bəndlərin xüsusi profili müşahidə olunur. Amma, DN-aza I ilə parçalamadan öncə ucu-nişanlanmış DNT ilə inkubasiya olunan TBP-nin miqdarını artıranda, TBP TATA boksa birləşir, sonra isə bütün nişanlanmış DNT-yə birləşmək üçün kifayət edən qədər TBP əlavə olunduqda təxminən –35-dən –20 qədər rayonu parçalanmaqdan qoruyur. Əksinə, TFIID-nin miqdarının artması (7 və 8-ci sıralar) həm TATA boks rayonunu DN-aza I ilə parçalanmaqdan qoruyur, həm də –7, +1, +5, +10, +15 və +20 rayonları yaxınlığında TBP-dən fərqli olan başqa bir "futprinti" yaradaraq qoruyur. Bu cürə nəticələr bizə göstərir ki, TFIID-nin başqa subvahidləri (TBP ilə birləşən faktorlar və ya TAF) də TATA boksdan aşağıya istiqamətdəki rayonunda DNT-yə birləşirlər.

Gel-yerinidəyişməsi və ya *bənd-yerinidəyişmə sınağı* kimi də adlanan *elektroforetik mobillik yerinidəyişmə sınağı* (*electrophoretic mobility shift assay - EMSA*), futprintinqdən daha əhəmiyyətli bir metod olub DNT-birləşdirən zülalların kəmiyyət analizlərini aparmağa imkan verir. Ümumilkidə, DNT fraqmentlərinin elektroforetik hərəkətliliyi onlar zülallarla kompleksdə olarkən azalır və fraqmentlərin bəndinin lokal yerdəyişməsinə səbəb olur. EMSA məlum nəzarət elementləri olan radionişanlanmış DNT fraqmentləri (prob) ilə inkubasiya olunmuş zülal fraksiyalarında transkripsiya faktorlaının aşkar olunmasında istifadə oluna bilir (Şəkil 9-25). DNT birləşdirmə reaksiyalarına nə qədər çox transkripsiya faktorları əlavə olunarsa, bir o qədər də çox nişanlanmış problar yerlərini DNT-zülal kompleksi vəziyyətinə dəyişirlər.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 9-25 Elektroforetik hərəkətlilik dəyişmə sınağı, transkripsiya faktorlarının təmizlənməsi zamanı təyinində istifadə oluna bilər. Bu nümunədə, kolonka xromotoqrafiyası ilə ayrılmış zülal fraksiyaları, onların məlum tənzimləyici elementlərə malik olan radionişanlanmış DNT-fraqmenti probları ilə birləşə bilmək qabliyyətinə görə yoxlanıldı. Zülal nümunəsinin alikvotu kolonkaya yükləndikdən sonra (ON) və ardıcıl gələn kolonka fraksiyaları (nömrələr) nişanlanmış problarla inkubasiya olundular, nümunələr zülal-DNT əlaqələrini qırmayan şərait altında elektroforez olundular. Zülala birləşməyən sərbəst prob gelin aşağısında miqrasiya edir. Kolonkaya köçürülən preparatdakı və 7-ci və 8-ci fraksiyalarda proba birləşmiş zülal, sərbəst zülalla müqayisədə daha zəif sürətlə miqrasiya edən DNT-zülal kompleksini yaradırlar. Ona görə də çox guman ki, bu fraksiyalar axtarılan tənzimləyici zülala malikdirlər. [Yoshinaga, S. et al., "Purification and characterization of transcription factor IIIC2," *J. Biol. Chem*., 1989, **264**:10726 ©1989 American Society for Biochemistry and Molecular Biology-dən.]

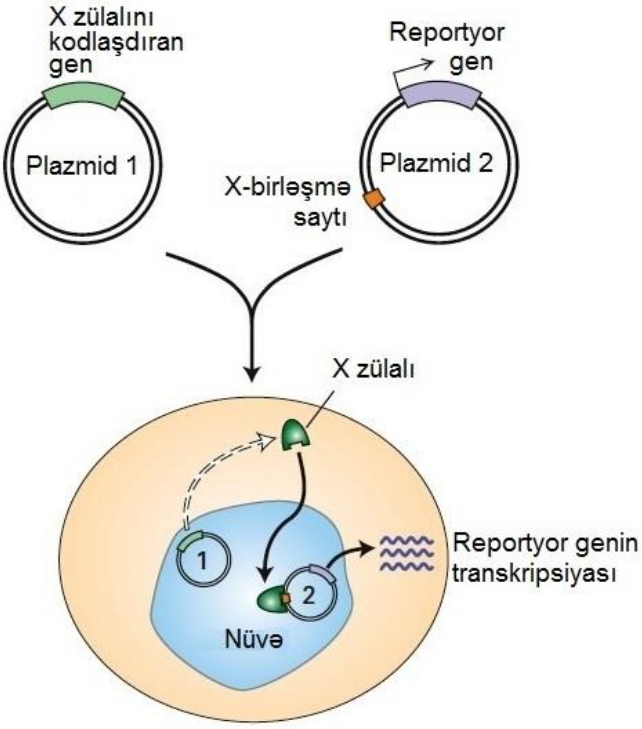
Transkripsiya faktorlarının biokimyəvi təmizlənməsi prosesində, bir qayda olaraq nüvə ekstraktı bir-neçə tip ardıcıl xromotoqrafiya kolonkalarında fraksiyalara ayrılmağa məruz qoyulmuşdur (Fəsil 3). Kolonkadan elusiya olunmuş fraksiyalar identifikasiya olunmuş, tənzimləyici elementlərə malik olan DNT fraqmentlərindən istifadə etməklə DN-aza I ilə Futprintinqə və ya EMSA-ya məruz qoyulmuşdur (bax Şəkil 9-22). Bu yoxlama zamanı tənzimləyici elementlərə birləşən zülallara malik olan fraksiyalar, ehtimal edilən transkripsiya faktorlarına malik olurlar. Transkripsiya faktorlarının təmizlənməsinin son mərhələsində istifadə olunan çox güclü metod, transkripsiya faktoru-birləşdirmə saytının çoxsaylı nüxsəsinə malik olan DNT zəncirinin kolonka matrisasına birləşdiyi (immobilizə olunduğu) affinlik xromotoqrafiyanın bir tipi olan və ümumi istifadə edilən *ardıcıllıq-spesifik DNT affinnliyi xromotoqrafiyasıdır*.

Transkripsiya faktoru ayrıldıqdan və təmizləndikdən sonra onun qismən aminturşu ardıcıllığı təyin edilə bilər və Fəsil 6-da təsvir olunduğu kimi, onu kodlaşdıran genin və ya kDNT-nin klonlaşdırılmasında istifadə oluna bilər. Sonra, ayrılmş gen in vivo transfeksiya yoxlamaları ilə kodlaşdırıcı zülalın transkripsiyanı fəallaşdırmaq və ya repressiya etmək qabliyyətinə malik olmasını yoxlamaq üçün istifadə oluna bilər (Şəkil 9-26).

Aktivatorlar Müxtəlif Funksional Domenlərdən Təşkil Olunmuşlar

GAL4 adlanan maya transkripsiya aktivatoru ilə aparılan tədqiqatlar, transkripsiya faktorlarının domen quruluşuna aid ilkin bilikləri təqdim etdi. Qalaktozanın metabolizmi üçün tələb olunan fermentlərin ekspressiyasını təşviq edən GAL4 zülalını kodlaşdıran gen, karbon və enerji mənbəyi kimi yalnız qalaktoza daxil edilmiş aqar mühütində koloniyalar yarada bilməyən *gal*4 mutantların komplementasiya analizləri ilə identifikasiya olundu (bax Fəsil 6). Əvvəllər təsvir olunduğu kimi, istiqamətləndirilmiş mutagenez tədqiqatları ilə GAL4-lə fəallaşan genlər üçün UAS-lər identifikasiya olundular. Aşkar olundu ki, bu UAS-lərin hər biri, UAS_{GAL} adlanan, 17 əsas cütlü ardıcıllığın bir və ya daha artıq nüsxəsinə malikdir. Maya *GAL*4 genindən *E. coli* vasitəsi ilə istehsal olunmuş rekombinant GAL4 zülalla aparılan DN-aza futprintinq sınaqları göstərdi ki, GAL4 zülalı UAS_{GAL} ardıcıllıqlara birləşir. UAS_{GAL}-ın bir nüsxəsi β-qalaktozidaza reportyor genin TATA boksunun ardınca klonlaşdırılarkən β-qalaktozidazanın ekspressiyası qalaktoza mühütində təbii-formalı hüceyrələrdə fəallaşdırıldı, amma *gal4* mutantlarda fəallaşdırılmadı. Bu nəticələr göstərdi ki, UAS_{GAL}, qalaktoza mühitində GAL4 zülalla fəallaşan transkripsiya-nəzarət elementidir.

gal4 silinmə mutantları ilə aparılmış diqqətəlayiq təcrübələr toplusu göstərdi ki, GAL4 transkripsiya faktoru ayrıla bilən funksional domenlərdən təşkil olunmuşlar: xüsusi DNT ardıcıllıqlarına birləşən N-sonluq **DNT-birləşdirən domen**, və C-sonluq **fəallaşdırıcı domen** yaxınlıqdakı promotordan transkripsiyasını stimullaşdırmaq üçün başqa zülallarla qarşılıqlı əlaqəyə girir (Şəkil 9-27). GAL4-ün N-sonluq DNT-birləşdirən domeninin birbaşa onun öz C-sonluq rayonunun müxtəlif hissələri ilə qovşaq olunması və daxili ardıcıllıqların silinmisi ilə alınmış kəsik zülallar, Şəkil 9-26-da göstərildiyi kimi, in vivo yoxlama zamanı reportyor genin expressiyasını stimullaşdırmaq qabliyyətini saxlayır. Beləliklə zülalın daxili hissəsi GAL4-ün transkripsiya faktoru kimi fəaliyyət göstərməsi üçün tələb olunmur. Çoxsaylı amin turşularının sintezi üçün genləri tənzimləyən digər maya aktivatoru Gcn4 ilə aparılan buna bənzər eksperimentlər göstərdilər ki, o, C-sonluğunda təxminən 50 amin turşusundan ibarət olan DNT-birləşdirən domenə və zülal ardıcıllığının ortasına yaxın təxminən 20 amin turşusundan ibarət olan fəallaşdırma domeninə malikdir.

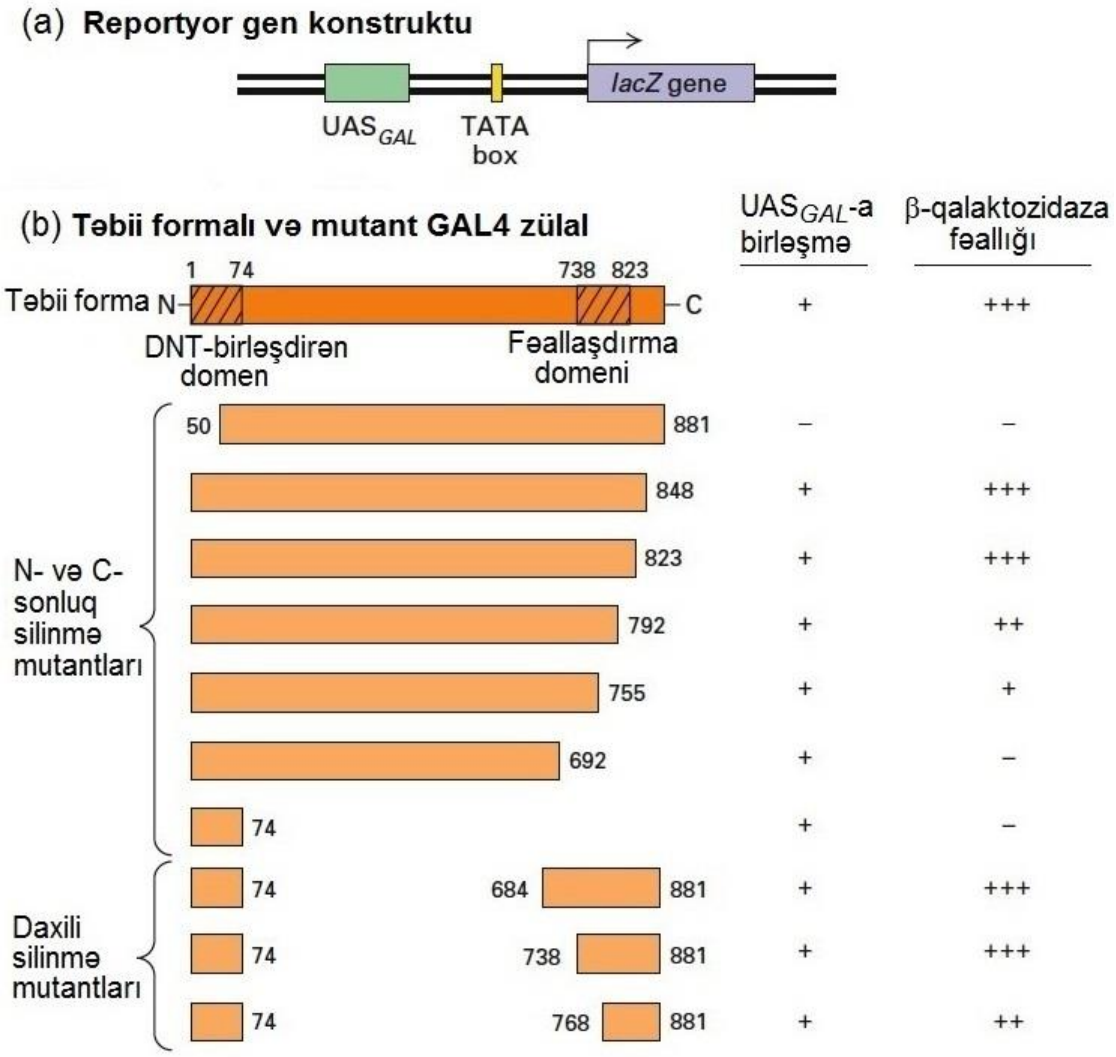


EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 9-26 Transkripsiya faktoru olan zülalları qiymətləndirmək üçün in vivo transfeksiya sınağı transkripsiya fəallığını ölçür. Bu sınaq sistemi iki plazmidi tələb edir. Bir plazmid, ehtimal olunan transkripsiya faktorunu (X zülalı) kodlaşdıran genə malikdir. İkinci plazmid isə reportyor genə (məsələn, lüsiferaza) və X zülalı üçün bir və ya daha artıq birləşmə saytına malikdir. Hər iki plazmid eyni zamanda X zülalını kodlaşdıran genə malik olmayan hüceyrəyə keçirilir. Reportyor-gen RNT transkriptlərinin istehsalı ölçülür; alternativ olaraq, kodlaşdırılan zülalın fəallığı da yoxlanıla bilər. Əgər reportyor-genin transkripsiyası X-kodlaşdıran plazmidin iştirakı ilə bu plazmid olmayan halla müqayisədə yüksəkdirsə, onda zülal aktivatordur, əgər transkripsiya səviyyəsi aşağıdırsa, onda, o repressordur. Mutasiya olunmuş və ya yenidən düzlənmiş transkripsiya faktorunu kodlaşdıran plazmidlərin istifadə olnması ilə zülalın əhəmiyyətli domenləri identifikasiya oluna bilər.

GaL4 və Gcn4-də müxtəlif fəallaşdırıcı domenlərin olması barədə daha sonrakı dəlil, onların fəallaşdırıcı domenlərinin, tamamilə yaxın olmayan *E. coli* DNT-birləşdirən zülalın DNT-birləşdirən domenində istifadə olunduğu eksperimentlərdən alınmışdır. Bu cürə qovşaq zülallar in vivo sınaq olunarkən, onlar *E. coli* zülalı üçün doğma sayta malik olan reportyor genin transkripsiyasını fəallaşdırdılar. Beləliklə, funksional

transkripsiya faktorları, eukariot və prokariotlara aid olan elementlərin tamamilə yeni kombinasiyasında konstruksiya oluna bilər.

Bu cürə tədqiqatlar artıq çoxsaylı müxtəlif eukariotik aktivatorlar üçün aparılmışdır. Bu tədqiqatlardan ortaya çıxan eukariot aktivatorlarının quruluş modeli, bir və ya daha artıq fəallaşdırıcı domenlərin daxilən pozulmuş dəyişkən zülal domenləri vasitəsi ilə ardıcıllıq-spesifik DNT-birləşdirən domenə birləşdiyi modulyar modeldir (Şəkil 9-28). Bəzi hallarda, DNT-birləşdirən domenə daxil olan amin turşuları da transkripsiyanın fəallaşmasına kömək edir. Sonrakı bölmələrdə müzakirə olunduğu kimi, belə hesab olunur ki, fəallaşdırıcı domen, transkripsiyaya daxil olan başqa zülalların birləşməsi ilə fəaliyyət göstərir. DNT-birləşdirən domni fəallaşdırıcı domenlə bağlayan daxilən pozulmuş dəyişgən zülal domenlərinin olması (bax Fəsil 3-8), nəzarət elementlərinin yerləşmələri arasındakı məsafənin (intervalın) dəyişilməsinin eukariot nəzarət rayonlarında nəyə görə belə davamlı olmasını izah edə bilər.

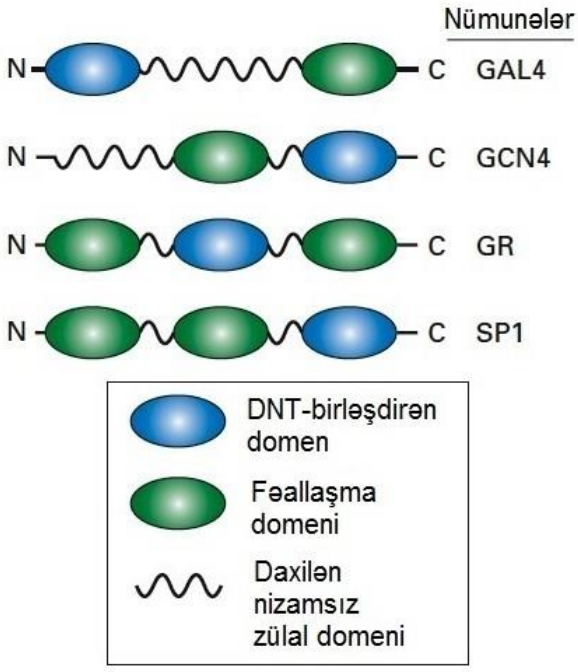


EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 9-27 Mayada GAL4 genin UAS_{GAL} reportyor gen konstruktu ilə silinmə mutantları transkripsiyanın aktivatorunda ayrıca funksional domenləri nümayiş etdirirlər. (a) *lac*Z reportyor genə (β-qalaktozidazanı kodlaşdıran) və bir neçə GAL4-birləşmə saytına malik olan UAS_{GAL} tənzimləyici elementə liqasiya olunmuş TATA boksa malik olan DNT konstruktun diaqramı. Reportyor gen-konstruktu və təbii formalı və ya mutant (silinmiş) GAL4 kodlaşdıran DNT birlikdə mutant (*gal4*) maya hüceyrələrinə keçirildi və β-qalaktozidazadan ekspressiya olunan *lac*Z-nin fəallığı yoxlanıldı. Əgər keçirilmiş GAL4 DNT funksional zülalı kodlaşdırırsa fəallıq yuxarı olacaq. (b) Təbii-formalı GAL4 və müxtəlif mutant formaların sxematik diaqramları. Kiçik nömrələr təbii-formalı ardıcıllıqların yerini bildirir. N-sonluqlu ucdan 50 amin turşusunun silinməsi GAL4-ün UAS_{GAL} ilə birləşmə qabliyyətini sıradan çıxarır və β-qalaktozidazanın reportyor gendən ekspressiyasını stimullaşdırır. C-sonluq ucundan geniş silinməyə məruz qalan zülallar hələ də UAS_{GAL}-a birləşə bilir. Bu nəticələr DNT-birləşdirən domenin yerləşməsinin GAL4-ün N-sonluğunda olduğunu təyin edir. β-qalaktozidazanın ekspressiyasını fəallaşdırmaq qabiliyyəti C-sonluqlu rayonunda, haradasa, 126 və 189-cu amin turşuları arasındakı və ya daha artıq qalıqların silindiyi haldan başqa qalan hallarda tamamilə ləğv olunmamışdır. Beləliklə fəallaşdırma domeni GAL4-ün C-sonluq rayonunda yerləşir. Daxili silinmələrə malik olan zülallar (*aşağıda*) da həmçinin β-qalaktozidazanın ekspressiyasını stimullaşdırmaq qabliyyətinə malik olur, bu göstərir ki, GAL4-ün mərkəzi rayonu bu yoxlama zamanı onun funksiyası üçün həlledici deyildir. Bax J. Ma and M. Ptashne, 1987, *Cell*, **48**:847; L.A. Hope and K. Struhl, 1986, *Cell*, **46**:885; R. Brent and M. Ptashne, 1985, *Cell* **43**:729.

Beləliklə, hətta DNT-yə birləşmiş transkripsiya faktorlarının yerləşmə mövqeləri bir-birinə uyğun olaraq dəyişəndə (sürüşəndə) onların fəallaşdırıcı domenləri hələ də qarşılıqlı təsirdə ola bilirlər, çünki onlar öz DNT-birləşdirən domenlərinə dəyişkən zülal rayonları ilə birləşirlər.

Repressorlar Aktivatorların Funksional Əksidir

Eukariotların transkripsiyası aktivatorlarla olduğu kimi repressorlarla da tənzimlənir. Məsələn, genetiklər mayada müəyyən genlərin dayanmadan fasiləsiz yüksək ekspressiyası ilə nəticələnən mutasiyanı aşkar etdilər. Bu tip tənzimlənməyən, qeyri normal yüksək ekspressiya **konstitutiv ekspressiya** adlanır və bu normal halda genin ekspressiyasını ingibirləşdirən repressorun fəallaşmaması nəticəsində yaranır. Buna bənzər olaraq, embrional inkişafda qüsurlu olan, *Drosophila* və *Caenorhabiditis elegans* mutantları ayrılmışdır, bu mutantlarda normal halda embrional hüceyrələrdə repressiya olunan genlər ekspressiya olunurlar. Bu mutantlarda mutasiyalar repressorları fəalsızlaşdırır və qeyri-normal inkişafa səbəb olurlar.



ŞƏKİL 9-28 Eukariot transkripsiya aktivatorlarının modulyar quruluşunu göstərən sxematik diaqramlar. Transkripsiya faktorları birdən artıq fəallaşdırma domeninə malik ola bilirlər, amma çox nadir hallarda birdən artıq DNT-birləşdirən domenə malik olurlar. Gal4 və Gcn4 maya transkripsiya aktivatorlarıdırlar. Müəyyən hormonlar qlikokortikoid reseptorların (GR) C-sonluq fəallaşdırıcı domeninə birləşdikdə onlar hədəf genin transkripsiyasını təşviq edirlər. Məməlilərin böyük sayda genlərində SP1 GC-zəngin promoter elementlərinə birləşir.

DNTdə repressor-birləşən saytlar, Şəkil 9-22-də göstərildiyi kimi, linker skaninq mutasiya analizləri yolu ilə identifikasiya olunmuşdur. Bu tipli analizlərdə aktivatora-birləşən saytın mutasiyası linker-reportyor genin ekspressiyasının azalmasına apardığı halda, repressora-birləşən saytın mutasiyası reportyor genin ekspressiyasının artmasına səbəb olur. Bu cürə mərkəzlərə birləşən repressor zülallar, əvvəllər aktivator zülallar üçün təsvir olunmuş biokimyəvi metodlardan istifadə edərərk təmizlənib sınaqdan keçirilə bilər.

Eukariotik transkripsiya repressorları aktivatorların funksional əksidirlər. Onların doğma birləşmə saytlarını normal halda onların tənzimləmədikləri genlərin start saytından onlarla əsas cütündən bir neçə kilo əsasa qədər məsafə daxilində yerləşdirərkən bu genlərdə transkripsiyanı ingibirləşdirə bilirlər. Aktivatorlar kimi, eukariot repressorların çoxu iki funksional domenə malik olan modulyar zülallardır: **DNT-birləşdirən domen** və **repressiya domeni**. Fəallaşdırma domenində olduğu kimi, repressiya domeni də başqa tip DNT-birləşdirən domenlərə qovşaq olunduqda fəaliyyət göstərməkdə davam edirlər. Əgər bu ikinci DNT birləşdirən domenin birləşdirmə saytları promotordan bir neçə yüz əsas cütü məsafədə daxil edilərsə, qovşağ zülalın ekspressiyası transkripsiyanın promotordan başlamasını ingibirləşdirir. Fəallaşdırıcı domen kimi, repressiya domenləri də, bu fəsildə sonra müzakirə olunduğu kimi, başqa zülallarla qarşılıqlı təsirdə olaraq fəaliyyət göstərirlər.

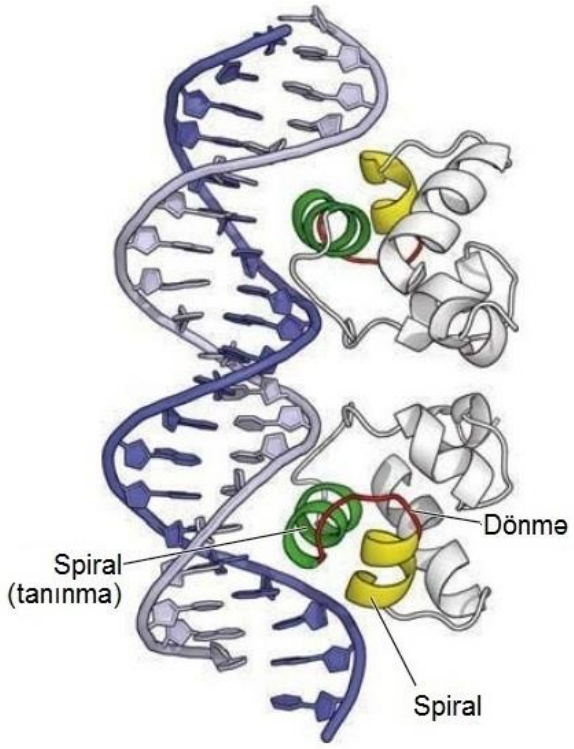
DNT-Birləşdirən Domenlər Çoxsaylı Quruluş Tiplərində Klassifikasiya Olunurlar

Eukariotik aktivatorların və repressorların DNT-birləşdirən domenləri, spesifik DNT ardıcıllığına birləşən müxtəlif quruluş motiflərinə malik olurlar. DNT-birləşdirən zülalların spesifik DNT ardıcıllığına birləşmək qabliyyəti adətən, DNT-birləşdirən domendə olan α spiraldakı atomlarla DNT-nin böyük şırımındakı əsasların kənarlarındakı atomlar arasında baş verən qeyri-kovalent əlaqələr nəticəsində yaranır. Müsbət yüklənmiş arginin və lizin qalıqları ilə şəkər fosfat özülündə mənfi yüklənmiş fosfatlar arasındakı ion əlaqələri və bir çox hallarda DNT-nin kiçik şırımındakı atomlarla qarşılıqlı təsir birləşməyə kömək edir.

Spesifik zülal-DNT əlaqələrinin əsasları ilk dəfə bakterial repressorların öyrənilməsi zamanı aşkar edilmişdir. Çox bakterial repressorlar dimer zülallardır, hər bir monomenrin α spiralı dupleks DNT spiralında böyük şırıma girir və orada çoxsaylı atomlarla əlaqə yaradır (Şəkil 9-29). Bu α spiral *tanıma spiralı* kimi və ya *ardıcıllıq-oxuyan spiral* kimi tanınır, çünki amin turşularının əksəriyyətinin DNT ilə əlaqədə olan yan zənciri məhz bu spirallardan çıxır. Bakterial repressorların səthindən dik çıxaraq DNT-nin böyük şırımına daxil olan və DNT-də çoxsaylı spesifik qarşılıqlı əlaqələri yaradan tanıma spiralı adətən zülalın quruluşunda ondan N-sonluğa tərəf yerləşmiş ikinci α-spiralda olam qismən hidrifob qarşılıqlı əlaqələrlə dəstəklənir. Çox bakterial repressorlarda mövcud olan bu quruluş elementi *spiral-dönmə spiral* (*helix-tirn-helix*) motifi adlanır.

α spiralını DNT-nin böyük şırımına təqdim edə bilən bir çox əlavə motiflər eukariot transkripsiya faktorlarında tapılmışdır və onlar çox vaxt malik olduqları DNT-birləşdirən domenin tiplərinə görə təsnifləşdirilirlər. Bu motiflərin əksəriyyəti xarakterik konsensus aminturşu ardıcıllıqlarına malik olduğundan potensial transkripsiya faktorları, insanda və başqa növlərdə xarakterizə olunan müxtəlif toxumalardan alınan

kDNT ardıcıllıqları arasında tanına bilirlər. Biz burada, üç-ölçülü quruluşu təyin edilmiş bir sıra DNT-birləşdirən zülalların ümumi siniflərini təqdim edirik. Bütün bu nümunələrdə və çoxsaylı digər transkripsiya faktorlarında ən azı bir α spiral DNT-nin böyük şırımına daxil edilir. Amma, bəzi transkripsiya faktorları DNT ilə qarşılıqlı təsirdə olan alternativ quruluş motiflərinə malik olurlar (məsələn, β zəncirlər və ilgəklər, misal üçün Şəkil 9-33-də NFAT-yə bax).



ŞƏKIL 9-29 Bakteriofaq 434 repressorun DNT ilə qarşılıqlı təsiri. Spesifik operon DNT-yə birləşmiş 434 repressorun lent diaqramı. Tanınma spiralı yaşıl rəngdə göstərilir. Repressor monomerlər sarı və yaşıl rəngdədirlər. Tanıma spiralına tərəf α spiralların N sonluğu və spiral-dönmə-spiral quruluş motifindəki spirallar arasında polipeptid özülündəki dönmələr müvafiq olaraq sarı və qırmızı rənglə göstərilir. Zülal DNT molekulunun bir tərəfində 1.5 dönmədən artıq məsafə boyunca sıx şəkildə qarşılıqlı əlaqədə olur. A.K. Aggarwal et al., 1988, *Science***242**:899, PDB ID 2 ori-dən götürülmüşdür.

Homeodomen Zülallar İnkişafın gedişi zamanı fəaliyyət göstərən çox eukariotik transkripsiya faktorları, **homeodomen** adlanan, konservativ 60 qalıqdan ibarət olan DNT-birləşdirən motifə malik olurlar və bunlar bakterial repressorlardakı spiral-dönmə-spiral motiflərinə oxşar olurlar. Bu transkripsiya faktorları ilk dəfə, inkişaf dövründə bir bədən hissəsinin başqasına transformasiya olunduğu *Drosophila* mutantlarında aşkar olunmuşdur (bax Şəkil 9-2b). Konservativ homeodomen ardıcıllıq, insanın inkişafında oxşar master-nəzarət fəaliyyətinə malik olan faktorlar da daxil olmaqla, onurğalıların transkripsiya faktorlarında da tapılmpşdır.

Sink-Barmaq Zülallar Çox sayda müxtəlif eukariotik zülallar, mərkəzindəki Zn^{2+} ionu ətrafında, nisbətən qısa uzunluqlu polipeptid zəncirlərindən ibarət olan kompakt domenləri yaradaraq bükülmüş rayonlara malikdirlər. Sink-barmaq adlandırılan bu quruluş motifi ilk dəfə DNT-birləşdirən domenlərdə tapılmışdır, amma indi onların DNT-birləşdirməyən zülallarda da mövcud olduğu məlumdur. Burada biz, eukariotik transkripsiya faktorlarında tapılmış sink-barmaq motif zülallarının bir-neçə sinifindən ikisini təsvir edəcəyik.

C_2H_2 *sink-barmaq* ən çox yayılan DNT-birləşdirən motif olub insan genomunda və başqa çoxhüceyrəli heyvanların əksəriyyətinin genomunda kodlaşdırılır. O, çoxhüceyrəli bitkilərdə də yayılmışdır, amma heyvanlarda olduğu kimi, bitkilərdə DNT-birləşdirən zülalların dominant tipini təşkil etmir. Bu motif 23-dən 26-qədər aminturşu qalıqlarının konsensus ardıcıllığından ibarətdir və yan zəncirləri Zn^{2+} ionlarına birləşmiş iki konservativ sistein (C) və iki konservativ histidin (H) qalıqlarına malikdir (Şəkil 3-10c). "Sink-barmaq" adı ona görə belə düşünülmüşdür ki, quruluşun iki-ölçülü diaqramı barmağı xatırladır. Üç-ölçülü quruluşu aşkar olunduqdan sonra, aydın oldi ki, Zn^{2+} ionlarının iki histidin və iki sistein qalıqlarına birləşməsi nisbətən qısa polipeptid ardıcıllığını kompakt domendə bükür, və onun α spiralını DNT-nin böyük şırımına daxil edə bilir. Çox transkripsiya faktorları çoxsaylı C_2H_2 sink barmaqlara malik olurlar və zülal ikizəncirli DNT ətrafında sarınarkən onlar DNT-nin boyük şırımında əsasların ardıcıl qrupları ilə əlaqə yaradırlar (Şəkil 9-30a).

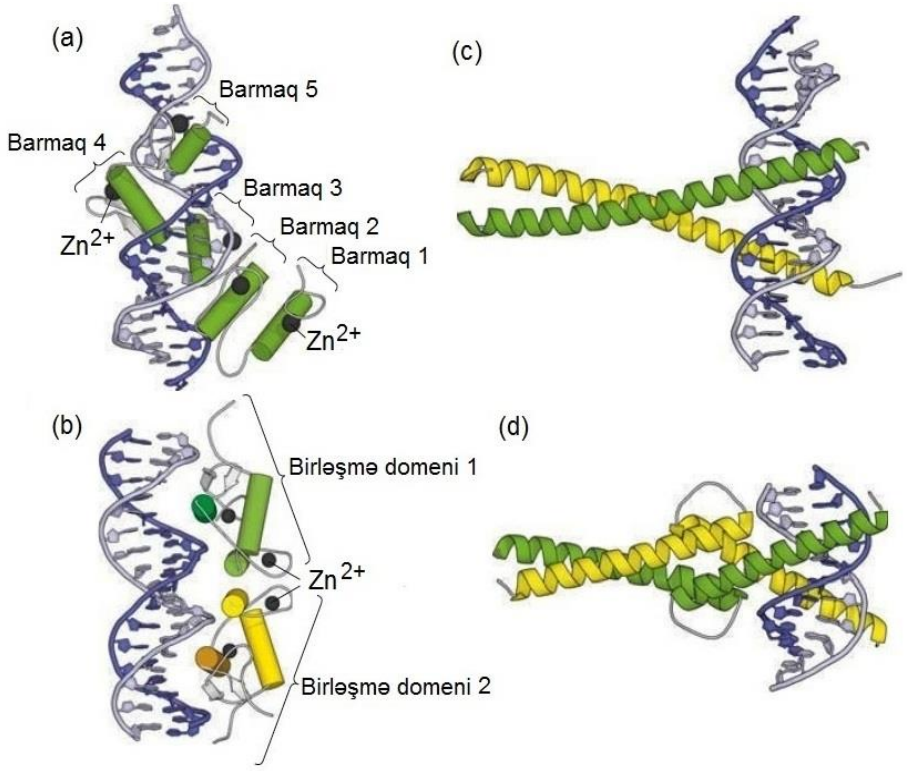
Sink-barmaq quruluşun C_4 *sink-barmaq* kimi təyin edilmiş (çünki onun dörd konservativ sistein qalıqları Zn^{2+} ilə əlaqədə olur) ikinci tipi, insanın təxminən 50 qədər transkripsiya faktorunda tapılmışdır. Bu sinfin ilk nümayəndələri, spesifik hüceyrə-daxili yüksək afinliklə birləşən zülallar və ya steroid hormonlar üçün "reseptorlar" kimi identifikasiya olunmuşlar, ona görə də *steroid reseptor superailəsi* kimi adlandırılırlar. Oxşar hüceyrədaxili reseptorlar qeyri-steroid hormonlar üçün də tapıldığından bu transkripsiya faktorları ümumilikdə **nüvə reseptorları** adlandırılırlar. C_4 sink-barmaqların xarakterik xüsusiyyəti onlarda dörd kritik sistein qalıqlarının, 55-56 qalıqdan ibarət olan domenin hər ucunda biri yerləşən iki qrupunun olmasıdır. Baxmayaraq ki, C_4 sink-barmaq ilkin olaraq C_2H_2 sink barmağa analoji olaraq adlandırılmışdır, bu DNT-birləşdirən motifə malik olan zülalların üç-ölçülü quruluşu onların kifayət qədər fərqli olduqlarını aşkar etmişdir. Bu iki qrup arasında xüsusən əhəmiyyətli fərq ondan ibarətdir ki, C_2H_2 sink-barmaq zülallar əsasən üç və ya daha artıq təkrarlanan barmaq vahidlərinə malik olurlar və DNT-yə monomerlər kimi birləşirlər, halbuki C_4 sink-barmaq zülallar əsasən iki barmaq vahidinə malik olub DNT-yə əsasən homodimer və ya heterodimer şəkilində birləşirlər. C_4 sink-barmaq DNT-birləşdirən domenlərin homodimerləri iki dəfə fırlanma simmetriyasına malikdirlər (Şəkil 9-30b). Bunun nəticəsində homodimer nüvə reseptorları, çevrilmiş (tərsinə) təkrarlardan ibarət olan konsensus DNT ardıcıllığına birləşirlər.

Leysin-zipper zülallar Transkripsiya faktorlarının böyük bir sinifinin DNT-birləşdirən domenlərində olan başqa bir quruluş motifi aminturşu ardıcıllığının hər yeddinci mövqeyində bir hidrofob amin turşusu leysin qalığına malikdir. Bu zülallar DNT-yə dimer kimi birləşirlər və leysinin mutagenezi göstərdi ki, onlar dimerləşmə üçün lazımdırlar. Uyğun olaraq, l**eysin-zipper** adı iki α spiralın spirallaşmış-spiraldakı bu quruluş motifini əks etdirmək üçün verilmişdir.

Əvvəldə qeyd olunmuş, mayadakı Gcn4 transkripsiya faktorunun DNT-birləşdirən domeni leysin-zipper domenidir. Gcn4 DNT-dirləşdirən domenlə DNT arasındakı kompleksin rentgen-kristalloqrafiya analizi göstərdi ki, dimer zülal DNT molekulunu "bərk-bərk tutan", iki uzanmış α spirala malikdir və bunlar bir-birindən ikiqat zəncirin yarım dövrəsi ilə ayrılmış iki qonşu şırımda birləşən bir cüt qayçı ağızlarına bənzəyirlər (Şəkil 9-30c). α spiralın DNT molekulu ilə əlaqədə olan hissəsələri, DNT özülündəki fosfatlar ilə əlaqə yaradan müsbət yüklənmiş (əsasi) qalıqlara və böyük şırımda spsifik əsaslarla əlaqə yaradan əlavə qalıqlara malikdirlər.

Gcn4 hidrofob qarşılıqlı təsir vasitəsilə α spiralların C-sonluq rayonları arasında dimerlər yaradır və **spirallaşmış-spiral** quruluşunu formalaşdırır. Bu quruluş, hidrofob amin turşu qalıqlarının ardıcıllıqda növbə ilə üç və ya dörd mövqedən bir müntəzəm yerləşdiyi və α spiralın yan tərəfində aşağıya doğru zolaq əmələ gətirdiyi amfipatik α spirallara malik olan zülallar üçün ümumidir. Bi hidrofob zolaqlar, spirallaşmış-spiral dimerində α spiral monomerlər arasında qarşılıqlı təsirdə olan səthləri yaradır (bax Şəkil 3-10a).

Hərçənd ki, ilk analiz olunan leysin zipper transkripsiya faktoru dimerləşmə rayonunda hər yeddinci mövqedə leysin qalqlarına malik olmuşdur, bu mövqedə başqa hidrofob aminturşularına malik olan əlavə DNT-birləşdirən zülallar da aşkar olunmuşdur. Leysin-zipper zülallar kimi, onlar da C-sonluqda spirallaşmış-spiral dimerləşmə rayonuna və N-sonluqda DNT-birləşdirən domenə malik olan dimerləri əmələ gətirirlər. İndi tez-tez hallarda, *əsasi zipper* (*basic zipper – bZIP*) sözü belə ümumi quruluşa malik olan bütün zülallar üçün istifadə olunur. Çox əsasi-zipper transkripsiya faktorları iki müxtəlif polipeptid zəncirin heterodimeridirlər və bu monomerlərin hər biri bir əsasi-zipper domenə malik olur.



ŞƏKIL 9-30 Spesifik DNT-ardıcıllığının böyük şırımı ilə əlaqə yaratmaq üçün α spiraldan istifadə edən eukariotik DNT-birləşdirən domenlər. (a) GL1 DNT-birləşdirən domen monomerdir və beş C_2H_2 sink barmağa malikdir. α spiral silindirlər şəkilində, Zn^{2+} ionalrı isə kürələr şəkilində göstərilmişdir. Barmaq 1 DNT ilə qarşılıqlı təsirdə olmur, amma digər dörd barmaq olur. (b) Qlikokortikoid reseptor homodimer C_4 sink-barmaq zülaldır, bir monomer yaşıl digəri isə sarıdır. α spirallar silindirlərlə, β vərəqlər ağ oxlar kimi, Zn^{2+} ionları isə kürələr kimi göstərilmişdir. Hər monomerdə biri olan iki α spiral (tünd kölgəli), DNT ilə qarşılıqlı əlaqədə olur. Bütün C_4 sink-barmaq homodimerlərdə olduğu kimi, bu transkripsiya faktoru iki dəfə fırlanma simmetriyasına malikdir. (c) Leysin-zipper zülallarda monomerlərin genişlənmiş α-spiral rayonlarında əsasi qalıqlar böyük şırımda olan yaxınlıqdakı saytda DNT özülü ilə əlaqə yaradır. Spirallaşmış-spiral dimerləşmə domeni monomerlər arasındakı hidrofob əlaqələrlə stabilləşir. (d) bHLH zülallarda, sağdakı DNT-birləşdirən spiral (monomerlərin N-sonluğunda) spirallaşmış-spiral dimerləşmə domeninə malik olan leysin zipperə-oxşar rayonundan qeyri spiral ilgəklərlə ayrılmışdır. [(a) hissəsinə görə bax N.P. Paveletich and C.O. Pabo, 1993, *Science*, **261**:1701; (b) hissəsinə görə bax B.F. Luisi et al., 1991, *Nature*,**352**:497; (c) hissəsinə görə bax T.E. Ellenberger et al., 1992, *Cell*, **71**:1223, PDB ID lysa. (d) hissəsi P. Brownlie et al., 1997, *Structure* **5**:509, PDB ID 1hlo bax.]

Əsasi Spiral-İlgək-Spiral (Basic Helix-Loop-Helix – bHLH) Zülallar Dimer transkripsiya faktorlarının başqa bir sinifinin DNT-birləşdirən domeni əsasi-zipper motifə bənzər olan quruluş motifinə malikdir, bir istissna ondan ibarətdir ki, hər bir monomerdə polipeptid zəncirin qeyri-spiral ilgəyi iki α-spiral rayonunu ayırır (Şəkil 9-30d). Əsasi spiral-ilgək-spiral (bHLH) kimi adlandırılan bu motif DNT ilə qarşılıqlı təsirdə olan əsasi qalıqlardan ibarət olan N-sonluqlu α-spirala, orta ilgək rayonuna və spirallaşmış-spiralda dimerləşən amfipatik α-spirala xarakterik intervalda yerləşən hidrofob amin turşulu C-sonluqlu rayona malik olan bu zülalların aminturşu ardıcıllığından proqnozlaşdırılmışdır (təxmin edilmişdir). Əsasi-zipper zülallarda olduğu kimi, müxtəlif bHLH zülallar heterodimerləri yarada bilirlər.

Quruluşuna Görə Fərqli Aktivator və Repressor Domenlər Transkripsiyanı Tənzimləyir

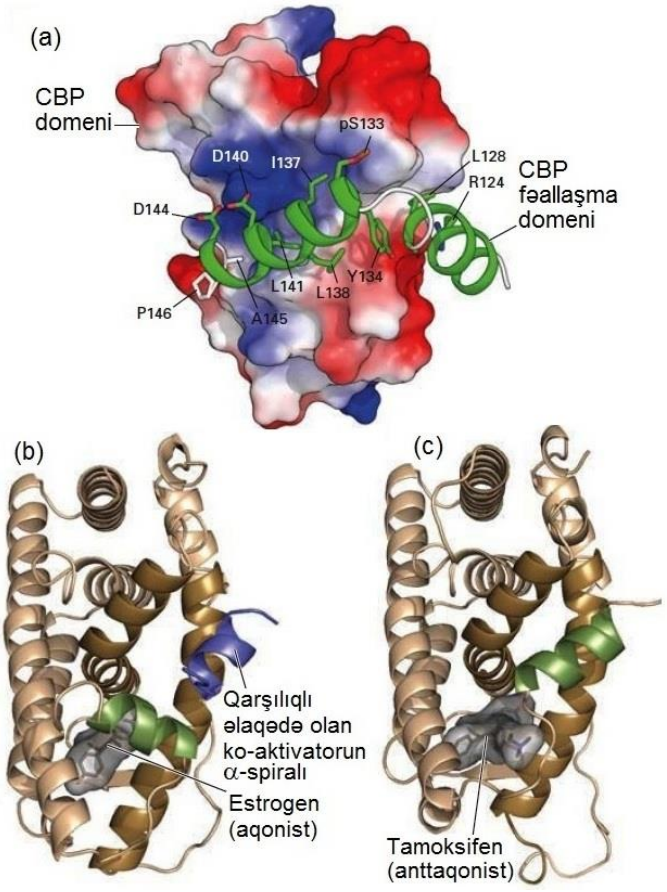
GAL4 DNT-birləşdirən domendən və *E. coli* zülalların nizamsız seqmentlərindən ibarət olan qovşaq zülallarla aparılmış eksperimentlər göstərdi ki, aminturşu ardıcıllıqlarının fərqli bir

qrupu (bütün *E. coli* ardıcıllıqlarının ~1 faizi), hətta digər funksiyaları yerinə yetirmək üçün yaransalar da, fəallaşdırma domenləri kimi fəaliyyət göstərə bilirlər. Çox transkripsiya faktorları xüsusi amin turşularının qeyri-adi dərəcədə yüksək faizi ilə fərqlənən fəallaşdırma domeninə malikdirlər. Məsələn, Gal4, Gcn4 və maya transkripsiya faktorlarının başqa böyük əksəriyyəti turş amin turşuları (asparagin və qlutamin turşuları) ilə zəngin olan fəallaşdırma domeninə malikdirlər. *Turş fəallaşdırma domenlıri* adlandırılan bunlar demək olar ki, bütün eukriotlarda – göbələk, heyvan və bitki hüceyrələrində transkripsiyanı stimullaşdırma qabliyyətinə malikdirlər. *Drosophila* və məməlilərin bəzi transkripsiya faktorlarının fəallaşdırma domeni qlutaminlə-zəngin, bəzilərininki prolinlə-zəngindir, digərlərininki isə bunlara yaxın olan amin turşularından serin və treoninlə zəngindir, bunların da hər ikisi hidroksil qrupuna malikdirlər. Amma, bəzi güclü fəallaşdırma domenləri hər hansı bir spesifik amin turşusu ilə xüsusi olaraq zəngin deyillər.

Biofiziki tədqiqatlar göstərdi ki, turş fəallaşdırma domenləri quruluşsuz, nizamsız-spirallı, daxilən pozulmuş konformasiya malikdirlər. Bu domenlər *ko-aktivator* adlanan zülallarla birləşən zaman transkripsiyanı stimullaşdırırlar. Ko-aktivatorlarla qarşılıqlı təsir fəallaşdırıcı domenin fəallaşdırıcı domen-ko-aktivator kompleksində daha çox quruluşlu α-spiral konformasiyası almasına səbəb olur. Turş fəallaşdırıcı domenə malik olan transkripsiya faktorlarının yaxşı öyrənilmiş nümunəsi məməlilərin, cAMP-nin yüksək qatılığına cavab olaraq fosforlaşan CREB zülalıdır. Belə tənzimlənən fosforlaşma CREB zülalına onun ko-aktivatoru CBP zülala (*CREB birləşdirən zülal*) birləşməsi üçün lazımdır, nəticədə nəzarət rayonunda CREB-birləşmə saytı olan genin transkripsiyası tənzimlənir (bax Şəkil 15-30). CREB-in fosforlaşmış nizamsız-spiral fəallaşdırma domeni CBP ilə qarşılıqlı təsirdə olanda, o konformasiya dəyişikliyinə uğrayaraq qısa ilgəklə birləşmiş CBP-nin qarşılıqlı təsir domeninə sarınan iki α spiralı əmələ gətirir (Şıkil 9-31a).

Bəzi fəallaşdırıcı domenlər turş fəallaşdırıcı domenlərdən daha böyükdürlər və daha çox quruluş təşkilinə malikdirlər. Məsələn, nüvə reseptorlarının liqand birləşdirən domenləri öz spesifik hormon liqandlarına birləşən zaman fəallaşdırıcı domen kimi fəaliyyət göstərirlər (Şəkil 9-31b, c). Liqandın birləşməsi, nüvə reseptorunda böyük konformasiya dəyişikliyini induksiya edir, bu da hormonla birləşmiş liqand-birləşdirən domenin ko-aktivatorlardakı qısa α spiralla qarşılıqlı təsir yaratmasını təmin edir, nəticədə əmələ gəlmiş kompleks, nəzarət rayonları nüvə reseptoruna birləşən genlərin transkripsiyasını fəallaşdıra bilir.

Beləliklə, CREB-də turş fəallaşma domeni və nüvə reseptorlarında liqand-birləşdirən fəallaşdırıcı domenlər iki quruluş ziddiyətini təmsil edir. CREB turş fəallaşdırma domeni daxilən pozulmuş nizamsız spiraldır, ko-aktivatorda qlobulyar domenin səthinə birləşən zaman iki spiralda bükülür. Əksinə, nüvə-reseptorunun liqand-birləşdirən fəallaşdırma domeni ko-aktivatordakı qısa α spiralla qarşılıqlı əlaqəyə girən, daha çox quruluş almış qlobulyar domendir və yəqin ki, birləşənə qədər nizamsız spirallardan ibarət olur. Amma, bu halda, ko-aktivatorla fəallaşdırıcı domen arasındakı spesifik zülal-zülal qarşılıqlı əlaqələri transkripsiya faktorlarının gen ekspressiyasını stimullaşdırmasına imkan verrir.



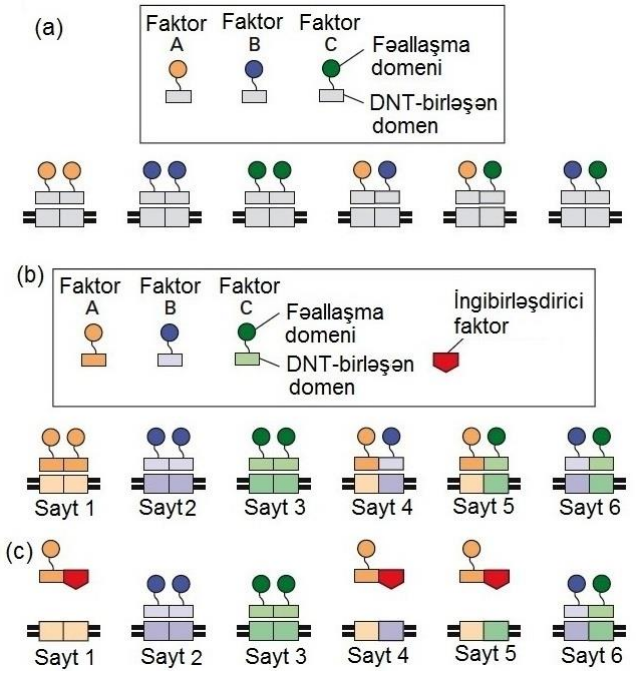
ŞƏKİL 9-31 Fəallaşma domenləri ko-aktivator zülallarla və ya bükülmüş zülal domenləri ilə qarşılıqlı təsirdə olana qədər təsadüfi spirallar kimi ola bilirlər. (a) CREB-in (cyclic AMP respense element-binding protein – tsiklik AMP cavab elementi-birləşdirən zülal) fəallaşdırma domeni serin 123-ün fosforlaşması ilə fəallaşır. O, özünün ko-aktivator domeni CBP ilə qarşılıqlı təsir yaradana qədər nizamsız spiral şəkilində olur (fəza-dolduran səth modeli şəkilində, mənfi yüklənmiş rayonlar qırmızı, müsbət yüklənmiş rayonlar isə mavi rəngdə göstərilir). CREB fəallaşdırma domeni CBP ilə birləşəndə o iki amfipatik α spiralda qatlanır. CBP domenin səthi ilə qarşılıqlı təsir yaradan fəallaşdırma domenindəki yan zəncirlər nişanlanır. (b) Estrogen reseptorun liqand-birləşdirən fəallaşdırma domeni bükülmüş zülal domenidir. Estrogen domenə birləşərkən yaşıl α spiral liqandla əlaqəyə girir və liqand birləşdirən domendə (tünd qonur spiral) hidrofob şırımı yaradır və ko-aktivator subvahiddə amfipatik α spirala birləşir (mavi). (c) Hormon olmayanda estrogen reserptorun konformasiyası onun estrogen antoqonisti tamoksifenlə birləşməklə stabilləşir. Bu konformasiyada reseptorun yaşıl spiralı fəal reseptorun ko-aktivator-birləşdirən şırımı ilə qarşılıqlı təsir yaradan konformasiyada bükülür, ko-aktivatorun birləşməsinə məkanca mane olur. [(a) hissəsi Radhakrishnan et al., 1997, *Cell*,**91**:741, PDB ID 1kdx. (b) və (c) hissələri A.K. Shiau et al., 1998, *Cell*, **95**:927, PDB ID 3erd and 3ert.]

Hal-hazırda repressiya domeninin quruluşu barədə çox az məlumat var. Bəzi nüvə reseptorlarının qlobulyar liqand-birləşdirən domenləri, spesifik hormon liqandları olan hallarda repressiya domeni kimi fəaliyyət göstərirlər. Fəallaşdırma domeni kimi repressiya domeni də ola bilsin ki, nisbətən qısadır, 15 və ya daha az amin turşusundan təşkil olunmuşdur. Biokimyəvi və genetik tədqiqatlar göstərir ki, repressiya domeni də zülal-zülal qarşılıqlı əlaqəsində vasitəçidir və *ko-repressor*

zülala birləşirək, bu fəsildə sonra müzakirə olunan mexanizmlə transkripsiyanın inisiasiyasını ingibirləşdirən kompleksi yaradırlar.

Transkripsiya Faktoru Qarşılıqlı Əlaqələri Gen-Nəzarəti Imkanlarını Artırır

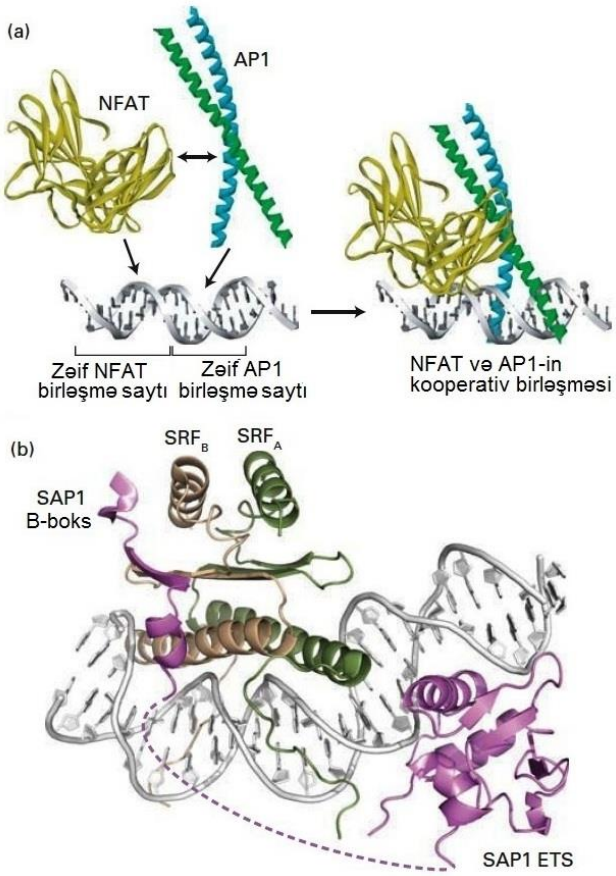
Əvvəldə müzakirə olunan iki tip DNT-birləşdirən zülal — əsasi-zipper zülallar və bHLH zülallar — çox hallarda, monomerlərin alternativ heterodimer kombinasiyalarında mövcud olurlar. Burada müzakirə olunmayan başqa transkripsiya faktorları da heterodimer zülalları yaradırlar. Bəzi heterodimer transkripsiya faktorlarında hər bir monomer eyni ardıcıllığı tanıyır. Belə olan hallarda, alternativ heterodimerin formalaşması monomerlərin təsir edə biləcəyi fərqli saytların sayını artırmır, əksinə, hər bir monomerlə assosasiyada olan fəallaşdırma domenlərinin eyni sayta birləşən alternativ kombinasiyalarda birləşdirilməsinə imkan verir (Şəkil 9-32a). Bizim sonra bu fəsildə və növbəti fəsillərdə görəcəyimiz kimi, fərdi transkripsiya faktorlarının fəaliyyəti çoxsaylı mexanizmlərlə tənzimlənə bilir. Bu səbəbdən, genin transkripsiya-nəzarət rayonunda vahid bZIP-birləşdirən və ya bHLH-birləşdirən DNT tənzimləyici elementi hüceyrədə hansı bZIP və ya bHLH monomerlərin ekspressiya olunmasından və onların fəallığının necə tənzimlənməsindən asılı olaraq fərqli transkripsiya cavab reaksiyalarını yarada bilirlər.



Amma, bəzi heterodimer transkripsiya faktorlarında hər bir monomer fərqli DNT-birləşdirmə spesifikliyə malikdir. Nəticədə yaranan kombinasiyaya asaslanmış imkan transkripsiya faktorları ailəsinin birləşə biləcəyi potensial DNT ardıcıllıqlarının sayını artırır. Üç müxtəlif faktorun monomerləri nəzəri olaraq, Şəkil 9-32b-də təsvir olunduğu kimi, altı homo- və heterodimer faktorları yaratmaq üçün kombinasiya oluna bilirlər. Dörd müxtəlif monomer cəmi 10 dimer faktorları, beş monomer 16 dimer faktorları və sair bu minvalla yarada bilərlər. Bundan əlavə, məlumdur ki, ingibitor faktorlar bəzi əsasi-zipper və bHLH monomerlərə birləşir və onların DNT-yə birləşməsiunə mane olur. Bu ingibitor faktorları ekspressiya olunanda, onlar qarşılıqlı əlaqədə olduqları faktorlarla transkripsiyanın fəallaşmasını repressiya edirlər (Şəkil 9-32c). Beləliklə heterodimer transkripsiya faktoru ailəsinin nümayəndələrinin qarşılıqlı əlaqəsini idarə edən qaydalar mürəkkəbdir. Bu cürə kombinasiya olunan mürəkkəblik həm bu faktorların transkripsiyanı fəallaşdıra biləcəyi DNT saytlarının sayını həm də onların tənzimlənə biləcəyi yolları artırır.

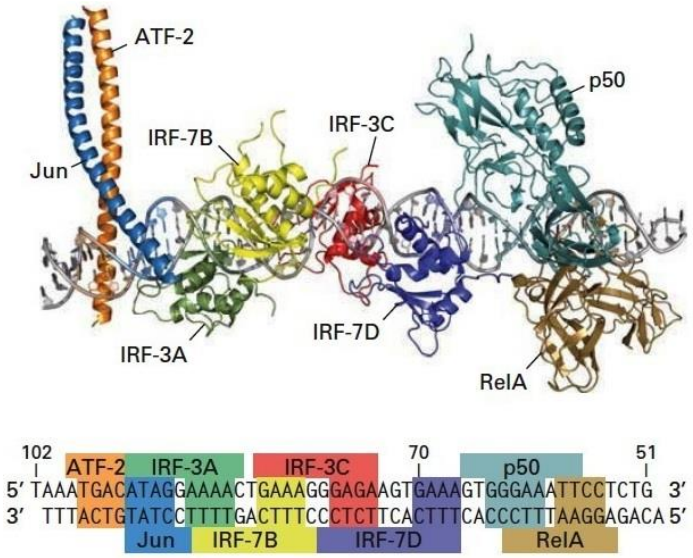
Oxşar kombinatorial transkripsiya tənzimlənməsi, bir-birinə yaxın yerləşmiş DNT birləşmə saytlarına birləşən, quruluşuna görə bir-birinə yaxın olmayan transkripsiya faktorları vasitəsi ilə əldə olunur. Buna misal olaraq, interleykin-2-ni (IL-2) kodlaşdıran geni tənzimləyən mürəkkəb promotor-proksimal elementlərdə qonşu saytlara birləşən NAFT və AP1 iki transkripsiya faktorlarının qarşılıqlı əlaqəsini göstərmək olar. *IL*-2 genin ekspressiyası immun cavabı üçün kritik əhəmiyyətlidir, amma IL-2-nin qeyri-normal ekspressiyası revmatid artrit kimi autoimmun xəstəliyinin yaranmasına səbəb olur (bax Fəsil 23). Nə NAFT, nə də AP1, digərinin olmadığı halda *IL*-2-nin nəzarət rayonunda öz birləşmə saytına birləşmir. Bu faktorların belə xüsusi DNT ardıcıllığına afinnliyi fərdi faktorun DNT ilə stabil kompleks yaratması üçün çox aşağıdır. Amma, NFAT və AP1 hər ikisi mövcud olanda, onlar arasındakı zülal-zülal əlaqəsi NFAT, AP1 və DNT-dən təşkil olunmuş üçqat kompleksi stabilləşdirir (Şəkil 9-33a). Müxtəlif transkripsiya faktorlarının bu cürə *kooperativ DNT birləşdirməsi* transkripsiya nəzarətinin əhəmiyyətli dərəcədə kombinasiya olunan mürəkkəbliyi ilə nəticələnir. Bunun nəticəsində, insan genomunda kodlaşdırılan təxminən 1400 və ya daha çox transkripsiya faktorları daha böyük sayda kooperativ qarşılıqlı əlaqələr vasitəsi ilə DNT-yə birləşə bilir və nəticədə insan genomunda kodlaşdırılan 21000 yaxın genin hər biri üçün unikal transkripsiya nəzarəti yaranmış olur. *IL-2* olan halda, transkripsiya yalnız o zaman baş verir ki, NFAT fəallaşır, bu onun sitoplazmadan nüvəyə daşınası ilə nəticələnir və AP1-in hər iki subvahidi sintezi olunur. Bu iki hadisə fərqli siqnal ötürülməsi yolları ilə nəzarət olunur (bax Fəsil 15 və 16) və IL-2-nin ekspressiyasına ciddi nəzarətə olunmasına imkan verir.

ŞƏKİL 9-32 Heterodimer transkripsiya faktorlarının formalaşmasının kombinatorial imkanları. (a) Bəzi heterodimer transkripsiya faktorlarında hər bir monomerin fəallaşdırma domeni eyni DNT ardıcıllığını tanıyır. Göstərilən hipotetik nümunədə, transkripsiya monomerləri A, B və C hamısı bir-biri ilə qarşılıqlı təsirdə ola bilirlər və fəallaşdırma domeninin eyni sayta birləşə bilən altı müxtəlif alternativ kombinasiyasını yarada bilirlər. Hər bir komposit birləşmə saytı iki yarımsayta bölünür, hər bir heterodimer faktor isə onu təşkil edən iki monomerin fəallaşdırma domenlərinə malikdir. (b) Transkripsiya-faktoru monomerləri fərqli DNT ardıcıllıqlarını tanıyanda, hər biri unikal cüt fəallaşdırma domeni ilə A, B və C transkripsiya faktorları monomerlərinin altı alternativ kombinasiyası altı müxtəlif DNT ardıcıllığına (1-6-cı saytlar) birləşə bilir. (c) Yalnız faktor A-nın dimerləşmə domeni ilə əlaqədə olan ingibitor faktorunun (qırmızı) ekspressiyası birləşməni ingibirləşdirir, bu səbəbdən transkripsiyanın fəallaşması 1, 4 və 5-ci saytlarda ingibirləşir, amma 2, 3 və 6-cı saytlardakı fəallaşmaya təsir olunmur.



ŞƏKİL 9-33 İki qohum olmayan transkripsiya faktorunun mürəkkəb nəzarət elementlərində qonşu saytlara kooperativ birləşməsi. (a) Öz-özlüyündə həm monomer NFAT, həm də heterodimer AP1 transkripsiya faktorları *IL-2* promotor-proksimal rayonda müvafiq birləşmə saytlarına qarşı aşağı afinnliyə malikdirlər. NFAT və AP1 arasındakı zülal-zülal qarşılıqlı əlaqələri NFAT-AP1-DNT kompleksinə ümumi stabillik verir, belə ki, hər iki zülal komposit (mürəkkəb) sayta kooperativ birləşir. (b) Dimer SRF və monomer SAP1-in DNT-yə kooperativ birləşməsi onların birləşmə saytlarının bir-birindən 5-30 əc qədər ölçüdə ayrıldığı halda və SRF-lə qarşılıqlı təsirdə olan SAP1 domeni SAP1 polipeptid zəncirin dəyişkən linker rayonu vasitəsilə SAP1-in DNT-birləşdirən domeni ilə birləşərkən SAP1-in birləşmə saytı tərs çevriləndə baş verir (nöqtəli xətt). [(a) hissəsi L. Chen et al., 1998, *Nature*, **392**:42, PDB ID 1a02-dən; (b) hissəsi M. Hassler and T.J. Richmond, 2001, *EMBO J.* **20**:3018, PDB ID 1hbx-dən.]

NFAT və AP1 ilə kooperativ birləşmə o zaman baş verir ki, DNT-də onların zəif birləşmə saytları bir-birinə kifayət qədər yaxın yerləşsinlər. Səmərəli birləşmə üçün saytlar bir-birindən dəqiq məsafədə yerləşməlidirlər. Bəzi başqa transkripsiya faktorları və transkripsiya-nəzarət rayonları olan halda kooperativ birləşmə üçün tələb elə də ciddi olmur. Məsələn, *EGR-1* nəzarət rayonu SRF və SAP1 transkripsiya faktorlarının kooperativ birləşdiyi komposit (mürəkkəb) birləşmə saytına malikdir (Şəkil 9-33b). SAP1-in SRF ilə qarşılıqlı əlaqəyə girən domeni uzun, dəyişkən olduğundan bu iki zülal onların DNT-dəki fərdi saytları təxminən 30 əc qədər istənilən məsafədə ayrılmış olduğu halda və ya bir-birinə qarşı tərs çevrilmiş (inverted) olduğu halda kooperativ birləşə bilirlər.



ŞƏKİL 9-34 β-interferon enhanserində formalaşan enhanseosomun modeli. İki heterodimer faktor Jun/ATF2 və p50/RelA (NF-kB), və monomer transkripsiya faktorları IRF-3 və IRF-7-nin iki nüsxəsi bu enhanserdə altı üst-üstə düşən birləşmə saytlarına birləşirlər. Bax D. Penne, T.Mannatis and S. Harrison 2007, *Cell*, **129**:1111.

Çoxzülallı Komplekslər Enhanserləri Yaradırlar

Əvəllər qeyd olunduğu kimi, enhanserlər əsasən 50-dən 200 əsas cütünə qədər uzunluqda olurlar və bir sıra transkripsiya faktorlarının birləşmə saytlarını əhatə edirlər. Onurğalılarda virus yoluxmalarına qarşı müdafiədə çox əhəmiyyətli zülal olan β-interferonun ekspressiyasını tənzimləyən təxminən 50-əc enhanserin analizləri, enhanseri təşkil edən bir sıra transkripsiya-faktorları-birləşdirən saytlara birləşmiş transkripsiya faktorlıarının DNT birləşdirən domenlərinin quruluşunun yaxşı nümunəsini təqdim edir (Şəkil 9-34). **Enhanseosom** sözü, enhanserdə öz birləşmə saytlarına birləşən çoxsaylı transkripsiya faktorlarından toplanmış, bu cürə çox böyük DNT-zülal kompleksini təsvir etmək üçün düşünülmüşdür.

Transkripsiya faktorlarında DNT-birləşdirən domenləri və transkripsiya faktorlarındakı fəallaşma və ya repressiya domenlərini birləşdirən dəyişkən rayonlar mövcud olduğuna görə (bax Şəkil 9-28) və uzaq saytlara birləşmiş qarşılıqlı təsirdə olan zülalların DNT-də öz birləşmə saytları arasında ilgək əmələ gətirmək qabliyyətinə (bax Şəkil 9-5) görə, transkripsiya-təzarət rayonunda tənzimləyici elementlər arasındakı məsafədə kifayət qədər kənaraçıxma yolverilən dir. Spesifik transkripsiya faktorlarının birləşmə saytları arasında və əsas transkripsiya faktorlarının və Pol II-nin promotorda birləşmə saytları arasında dəyişkən məsafənin olmasındakı bu tolerantlıq yəqin ki, eukariotlarda gen nəzarətinin sürətli təkamülünə kömək etmişdir. DNT ardıcıllıqlarının transpozisiyası və təkrarlanan ardıcıllıqlar arasında rekombinasiya təkamül müddətində çox güman ki, nəzarət elementlərinin yeni kombinasiyasını yaratmışdır, bunlar da təbii seçməyə məruz qalmış və əhəmiyyətli hesab olunduqları halda qorunub saxlanmışlar.

Tənzimləyici elementlər arasındakı intervalda genişlik yəqin ki, bakteriyalardakı genlərin əksəriyyətində olduğu kimi, tənzimləyici elementlər arasındakı intervalda məhdudiyyətlərin ciddi saxlanılmasına deyil, daha çox əlavə funksional kombinasiyaların təkamül eksperimentlərinə məruz qalmasına imkan vermişdir.

9.4 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSIYALARI

Zülal-kodlaşdıran Genlərin Tənzimləyici Ardıcıllıqları və Onların Fəaliyyət Göstərdiyi Zülallar

- Eukariotik zülal-kodlaşdıran genlərin ekspressiyası, əsasən transkripsiyanın start saytına yaxın və ya uzaq yerləşən, çoxsaylı zülal-birləşdirən nəzarət rayonlarından tənzimlənir (Şəkil 9-23)
- Promotorlar RNT polimeraza II-nin DNT-yə birləşməsini istiqamətləndirir, transkripsiyanın inisiasiya (başlama) saytını təyin edir və transkripsiyanın gedişinə təsir edir.
- Promotor-proksimal elementlər start saytından təxminən 200 əsas cütü məsafə daxilində yerləşirlər. 6-10 əsas cütünə malik olan bir sıra belə elementlər xüsusi bir genin tənzimlənməsinə kömək edə bilir.
- Çoxsaylı qısa nəzarət elementlərinə malik olan enhanserlər, ola bilər ki, promotordan 200 əsas cütündən onlarla kiloəsas məsafəyə qədər yuxarıya istiqamətdə və ya aşağıya istiqamətdə intron daxilində və ya genin sonuncu eqzonundan aşağıya istiqamətdə yerləşsin.
- Promotor-proksimal elementlər və emhanserlər çox hallarda hüceyrə-tipi spesifik olurlar və yalnız differensasiya olummuş spesifik hüceyrə tiplərində fəaliyyət göstərirlər.
- Transkripsiyanı repressiya edən və ya stimullaşdıran transkripsiya faktorları, eukariotik DNT-də promoter-proksimal tənzimləyici elementlərə və enhanserlərə birləşirlər.
- Transkripsiyanın aktivatorları və repressorları əsasən, vahid DNT-birləşdirən domenə və bir və ya bir neçə fəallaşdırma domeninə (aktivatorlarda) və ya repressor domeninə (repressorlarda) malik olan modulyar zülallardır. Müxtəlif domenlər tez-tez hallarda bir-biri ilə dəyişkən polipeptid rayonları vasitəsi ilə bağlı olurlar (bax Şəkil 9-28).
- Eukariotik transkripsiya faktorlarının DNT-birləşdirən domenlərində tapılmış quruluş motifləri arasında ən çox rast gəlinənləri homeodomenlər, C_2H_2 sink-barmaq, əsasi zipper (leysin zipper) və əsasi spiral-ilgək-spiral (basic helix-loop-helix – bHLH)-dırlar. Bütün bunlar və çoxsaylı başqa DNT-birləşdirən motiflər, DNT-də onlara doğma olan saytda böyük şırım ilə əlaqə yaradan bir və ya daha artıq α spirala malikdirlər.
- Transkripsiya faktorlarında domenlərin fəallaşması və ya repressiyası müxtəlif aminturşu ardıcıllıqlarını və üç-ölçülü quruluşu nümayiş etdirirlər. Ümumiyyətlə, bu funksional domenlər ko-aktivatorlar və ya ko-repressorlarla qarşılıqlı əlaqədə olurlar, bu da transkripsiya faktorlarının genlərin ekspressiyasını modulyasiya etmə qabliyyəti üçün kritik əhəmiyyətlidir.
- Genlərin əksəriyyətinin transkripsiya-nəzarət rayonları, çoxsaylı transkripsiya faktorları üçün birləşmə saytına malikdirlər. Belə genlərin trasnkripsiyası, xüsusi hüceyrələrdə və xüsusi zamanda ekspressiya olunan və fəallaşan transkripsiya faktorlarının xüsusi repertuarından asılı olaraq dəyişilir.
- Transkripsiyaya nəzarətin kombinatoryal mürəkkəbliyi heterodimer transkripsiya faktorlarını (bax Şəkil 9-32) formalaşdıran monomerlərin alternativ kombinasiyasından və transkripsiya faktorlarının komposit nəzarət saytlarına kooperativ birləşməsindən irəli gəlir (bax Şəkil 9-33).
- Çoxsaylı transkripsiya faktorlarının enhanserdəki çoxsaylı saytlara birləşməsi enhanseosom adlanan DNT-zülal kompleksini yaradır (bax Şəkil 9-34).

9.5 Transkripsiyanın Repressiyasının və Fəallaşmasının Molekulyar Mexanizmləri

DNT-də xüsusi sayta birləşərək bu saytla bağlı olan zülal kodlaşdıran genlərin ekspressiyasını tənzimləyən repressorlar və ya aktivatorlar bunu üç əsas mexanizmlə həyata keçirirlər. **Birinci**, bu tənzimləyici zülallar, xromatin quruluşunu modulyasiya etmək və əsas transkripsiya faktorlarının promotorlara birləşmə qabliyyətini ingibirləşdirmək və ya stimullaşdırmaq üçün başqa zülallarla birlikdə fəaliyyət göstərirlər. Fəsil 8-dən yada salaq ki, eukariotik hüceyrələrdə DNT sərbəst deyildir, təxminən onunla eyni kütlədə olan zülallarla **xromatin** şəkilində, birləşmiş vəziyyətdədir. Xromatinin əsas və ilkin quruluş vahidi, təxminən 147 əsas cütü uzunluqda DNT-nin **histon** zülalların disk-formasında yığılmış özəyi ətrafında sıx sarınmasından təşkil olunmuş **nukleosomdur**. Hər bir histonun N-sonluq rayonu daxilində olan və H2A və H2B histonların C-sonluq rayonları daxilində olan və *histon quyruqlar* adlandırılan qalıqlar nukleosomun səthində uzanır və geriyə dönə bilən şəkildə modifikasiya olunurlar (bax Şəkil 8-26b). Bu cürə modifikasiyalar xromatinin nisbi kondensasiyasına təsir edir və beləliklə, onun zülallar tərəfindən əlçatan olması transkripsiyanın inisiasiyası üçün tələb olunur. **İkinci**, aktivatorlar və repressorlar *transkripsiya kompleksinin mediatoru (vasitəçisi*) və ya sadəcə olaraq *Mediator* adlanan böyük çoxzülallı kompleksle qarşılıqlı əlaqə yaradırlar. Öz növbəsində bu kompleks, Pol II ilə birləşir və transkripsiyanın preinisiasiya kompleksinin toplanmasını tənzimləyir. Bundan başqa, bəzi fəallaşdırma domenləri, TFIID-TAF subvahidləri ilə və ya preisisiasiya kompleksinin başqa komponentləri ilə qarşılıqlı əlaqə yaradır, bu əlaqələr preinisiasiya kompleksinin toplanmasına kömək edir. Nəhayət, (**üçüncü**) fəallaşdırma domenləri, promoter rayonunda Pol II ilə elonqasiya etməni stimullaşdırmaq üçün elonqasiya faktoru P-TEFb (tsiklin T-CDK9) və hələ ki, məlum olmayan başqa faktorlarla qarşılıqlı əlaqə yarada bilirlər.

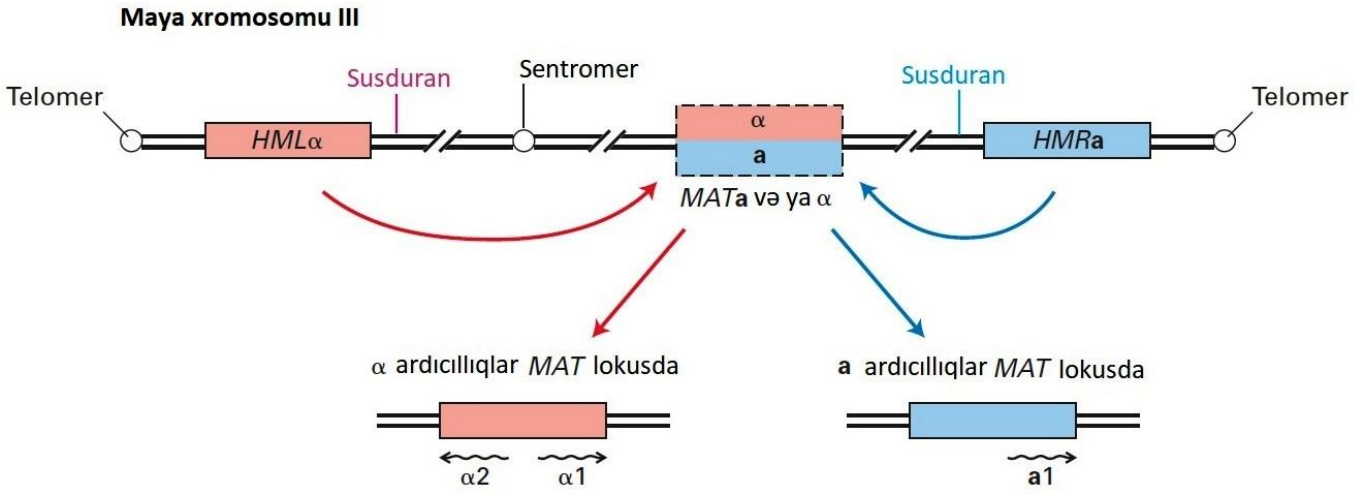
Bu bölmədə, biz, repressor və aktivatorların xromatinin quruluşuna və preinisiasiya kompleksinin toplanmasına necə nəzarət etdiyi barədə müasir anlayışları nəzərdən keçirəcəyik. Fəslin növbəti bölməsində isə biz, aktivatorların və repressorların özlərinin qatılıqlarına və fəaliyyətlərinə necə nəzarət etdiyini və beləliklə gen ekspressiyasını hüceyrənin və orqanizmin ehtiyaclarına dəqiqliklə uyğunlaşdırdığını müzakirə edirik.

Telomerlərdə, Sentromerlər Yaxınlığında və Başqa Rayonlarda Gen Ekspressiyasının Heteroxromatin Susdurulması ilə Formalaşması

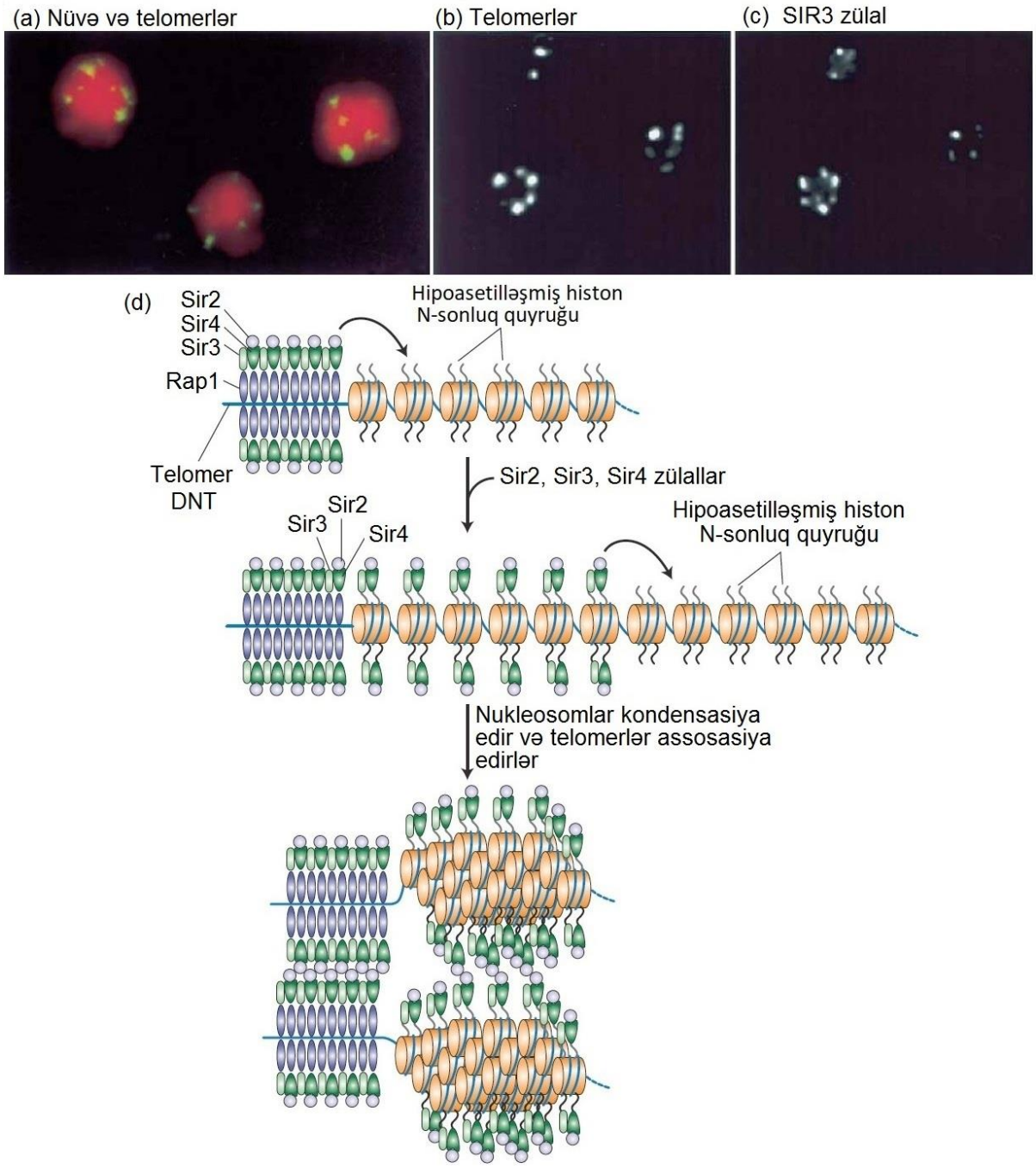
Uzun illər məlum idi ki, eukariot hüceyrələrdə qeyri fəal genlər çox hallarda, xromatinin daha yüksək kondensasiya olunmuş və transkripsiya olunan genlərin yerləşdiyi **euxromatinlə** müqayisədə DNT boyaları ilə daha tünd rənglənən xromatin rayonu olan **heteroxromatinlə** assosasiyada olurlar (bax Şəkil 8-28a). Sentromerlər və telomerlər yaxınlığındakı xromosom rayonları və müxtəlif hüceyrə tiplərində dəyişilən əlavə spesifik rayonlar heteroxromatin daxilinə düzlənmişlər. Əlavə olunmuş kənar zülallar üçün heterexromatin daxilindəki DNT euxromatin daxilindəki DNT-yə nisbətən daha az əlçatandır və uyğun olaraq çox hallarda "qapalı" xromatin adlandırılır. Məsələn, Fəsil 8-də təsvir olunmuş eksperimentdən qeyri fəal genlərin DNT-sinin ekspressiya olunan genlərin DNT-sinə nisbətən DN-aza I ilə parçalanmaya daha dözümlü olduğu aşkar olunmuşdur (bax Şəkil 8-27).

Özünü ali eukariotların heteroxromatini kimi aparan, *S. cerevisiae* DNT rayonlarının tədqiqatları transkripsiyanın *xromatinlə-vasitələnən repressiyası* istiqamətində ilkin anlayışları təqdim etdi. Bu maya hüceyrələri həm haploid həm də diploid hüceyrələr kimi imkişaf edə bilirlər. Haploid hüceyrələr, **a** və **α** adlanan iki cütləşmə tipindən birini nümayiş etdirirlər. Müxtəlif cütləşmə tipinə malik olan hüceyrələr diploid hüceyrələri əmələ gətirmək üçün "cütləşə" və ya qovuşa bilirlər (bax Şəkil 1-23). Haploid hüceyrələr tumurcuqlama yolu ilə bölünəndə daha böyük ana hüceyrə öz cütləşmə tipinə keçir. Genetik və molekulyar analizlər aşkar etdi ki, maya hüceyrəsinin III xromosomunda üç genetik lokus maya hüceyrələrinin bölünməsini idarə edir (Şəkil 9-35). Üç mərkəzi cütləşmə-tipi lokusundan fəal şəkildə transkripsiya olunan yalnız *MA*T adlanan biri, cütləşmə tiplərini tənzimləyən genlərə nəzarət edən transkripsiya faktorlarını ekspressiya edir (a1 və ya α1 və α2). İstənilən bir hüceyrədə, ya **a** ya da **α** DNT ardıcıllığı *MAT*-da yerləşir. Uyğun olaraq sol və sağ telomer yaxınlığında *HML* və *HMR* adlanan digər iki əlavə lokus, **a** və ya **α** genin "susan" (transkripsiya olunmayan) nüsxələrinə malikdirlər. Bu ardıcıllıqlar alternativ olaraq hüceyrə bölünməsi zamanı bacı xromosomlar arasında qeyri resiprokal rekombinasiya yolu ilə *HML***α** və ya *HMR***a**-dan *MAT* lokusa keçirilirlər. *MAT* lokus *HML***α** DNT ardıcıllığına malik olduqda hüceyrələr özlərini **α** hüceyrələr kimi aparırlar. *MAT* lokus *HMR***a** DNT ardıcıllığına malik olduqda isə hüceyrələr özlərini **a** hüceyrələr kimi aparırlar.

Burada bizim marağımız susan cütləşmə tipi genlərinin transkripsiyasının *HML* və *HMR*-də necə repressiya olunmasıdır. Əgər bu genlər, onların repressiya mexanizmi qüsurlu olan maya mutantlarında olduqları kimi ekspressiya olunmuşlarsa, həm **a,** həm də **α** zülallar ekspressiya olunuraq hüceyrələrin özlərini cütləşə bilməyən diploid hüceyrələr kimi aparmasına səbəb olurlar. **a** və **α** genlərin transkripsiyasına nəzarət edən promotorlar və UAS-lər keçirilmiş DNT ardıcıllığının mərkəzi yaxınlığında yerləşirlər və *MAT* lokusunda və ya susan lokusların birindəki ardıcıllıqlarla identikdirlər. Bu düzülüş göstərir ki, bu ardıcıllıqlarla qarşılıqlı əlaqədə olan transkripsiya faktorlarının fəaliyyəti necə də olsa, *MAT* lokusunda deyil *HML* və *HMR* lokuslarında dayandırılmalıdır. Susan lokusun bu repressiyası, *HML* və *HMR*-də keçirilmiş DNT rayonundan dərhal sonra yerləşən susduran ardıcıllıqdan asılıdır (şəkil 9-35). Əgər susduran ardıcıllıq silinərsə ona bitişik lokus transkripsiya olunur. Qəribədir ki, rekombinant DNT metodu ilə, cütləşən-tipli maya hüceyrəsində susdran ardıcıllıq yaxınlığına yerləşdirilən istənilən gen repressiya olunur və ya "susdurulur", sonra müzakirə edəcəyimiz kimi, hətta RNT polimeraza II-nin istifadə etdiklərindən fərqli olan əsas transkripsiya faktorları dəstini istifadə edən RNT polimeraza III ilə transkripsiya olunan tRNT geni də repressiya olunur.



ŞƏKİL 9-35 *S. cerevisiae* maya hüceyrələrində III xromosom üzərində cütləşmə-tipi lokusunun düzülüşü. Susan (ekspressiya olunmayan) cütləşmə-tipi genləri (istər **a,** istərsə də **α** genlər) HML lokusda yerləşirlər. Əks tərəf cütləşmə-tipi geni susan HMR lokusunda mövcuddur. **α** və ya **a** ardıcıllıqları *MAT* lokusunda mövcud olanda onlar mRNT-lərə transkripsiya oluna bilirlər və bu mRNT-lərin kodlaşdırdığı zülallar hüceyrənin cütləşmə tipi fenotipini müəyyən edir. HML və HMR yaxınlığında susduran ardıcıllıqlar, susan lokusların repressiyası üçün kritik olan zülallara birləşir. Haploid hcyrələr, DNT-nin HML-dən və ya HMR-dən fəal transkripsiya edən MAT lokusuna keçməsi prosesində cütləşmə tipinə keçə bilirlər.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 9-36 Anticism və DNT problar SIR3 zülalını maya nüvələrində telomer heteroxromatinlə ko-lokalizasiya edir. (a) Hər biri 68 telomerə malik olan 0.3 mm qalınlıqda üç diploid maya hüceyrəsinin konfokal mikrofotosu. Telomerlər, telomer-spesifik fluoressent problara (sarı) hibridləşdirməklə nişanlanmışlar. Nüvəni aşkar etmək üçün DNT qırmızı ilə rənglənmişdir. 68 telomer nüvə periferiyası yaxınlığında daha çox kiçik sayda olan rayonlarda dəstə ilə birləşmişlər. (b, c) Telomer-spesifik hibridləşmə probu (b) ilə və SIR3-ə spesifik olan anticismlə fluoressent nişanlanmış (c) maya hüceyrələrinin konfokal mikrofotosu. Qeyd edək ki, SIR3 repressiya olunmuş telomer heteroxromatində lokalozasiya olunmuşdur. RAP1, SIR2 və SIR4 ilə aparılmış oxşar eksperimentlər göstərdilər ki, bu zülallar da repressiya olunmuş telomer heteroxromatində ko-lokalizasiya olunublar. (d) Maya telomerlərində susma mexanismininn sxematik modeli. (*Yuxarıda solda*) RAP1-in çoxsaylı nüxsələri, hər bir telomerin nukleosom olmayan rayonunda sadə təkrarlanan ardıcıllığa birləşir. SIR3 və SIR4 RAP1-ə birləşir, SIR2 isə SIR4-ə birləşir. SIR2 histon deasetilazadır və təkrarlanan RAP1-birləşdirən sayta qonşu olan histonlarda quyruqları deasetilləşdirir. (*Ortada*) Hipoasetilləşmiş histon quyruqları da SIR3 və SIR4 üçün birlıəşmə saytlarıdır, o da öz növbəsində qonşu histonları deasetilləşdirərək əlavə SIR2-ni birləşdirir. Bu proseslərin təkrarlanması hipoasetilləşmiş histon rayonunun assosasiyada olduğu SIR2, SIR3 və SIR4-lə birlikdə yayılması ilə nəticələnir. (*Aşağıda*) SIR2, SIR3 və SIR4 komplekslər arasındakı qarşılıqlı əlaqə xromatinin kondensasiya olunmasına və a-c-də göstərildiyi kimi, bir sıra telomerlərin birləşməsinə səbəb olur. Yaranan yüksək-dərəcəli xromatin quruluşu başqa zülalların burada olan DNT ilə qarşılıqlı əlaqəsinin yaranmasına məkanca mane olur. Bax M. Grunstein, 1997, Curr. Opin. Cell Biol. **9**:38. [(a)-(c) hissələri, 1996, M. Gotta et al., *J.Cell Biol*. **134**:1349-1363, doi:10.1083/jcb.134.6134.]

Bir sıra sübutlar göstərdi ki, *HML* və *HMR* lokusların repressiyası kondensasiya olunmuş xromatin quruluşunun nəticəsidir və transkripsiya faktorlarının məkanca DNT ilə qarşılıqlı əlaqədə olmasının qarşısını alır. Aparılan eksperimentlərin birində, GATC ardıcıllıqlarında adenin qalıqlarını metilləşdirən *E. coli* fermentini kodlaşdıran gen, maya promotorunun nəzarəti altında maya hüceyrələrinə elə keçirilmişdir ki, ferment ekspressiya olunmuşdur. Tədqiqatçılar aşkar etmişdilər ki, *MAT* lokus daxilində və bu hüceyrələrdə genomun başqa rayonlarının çoxunda GATC ardıcıllıq HML və HMR lokuslarda olanlar istisna olmaqla metilləşmişdir. Bu nəticələr göstərir ki, susan lokusun DNT-si *E. coli* metilaza üçün əlçatmazdır və yəqin ki, transkripsiya faktorları və RNT polimeraza da daxil olmaqla ümumiyyətlə, zülallar üçün əlçatmazdı. Müxtəlif maya histon mutantları ilə də aparılmış oxşar eksperimentlər göstərir ki, H3 və H4-ün histon quyruqları daxil olmaqla spesifik qarşılıqlı əlaqələr tam repressiya olunmuş xromatin quruluşunun formalaşması üçün tələb olunur. Başqa tədqiqatlar da göstərdilər ki, hər bir maya xromosomunun telomerləri özlərini susduran ardıcıllıqlar kimi aparırlar. Məsələn, gen istənilən maya telomerinin bir neçə kilo-əsas məsafə daxilində yerləşdiriləndə onun ekspressiyası repressiya olunur. Bundan başqa, bu repressiya, susan mutant tipli lokusdakı repressiyaya müdaxilə edən (mane olan) H3 və H4 histon quyruqlarında olan eyni mutasiya ilə buraxılır.

Genetik tədqiqatlar, maya hüceyrələrində susan cütləşən-tipli lokusun və telomerin repressiyası üçün tələb olunan bir sıra zülalların, RAP1 və üç SIR zülalların identifikasiyasına gətirib çıxardı. Aşkar olundu ki, RAP1 *HML* və *HMR* ilə assosasiyada olan DNT-susduran ardıcıllıqla və hər bir maya xromosomunun telomerlərində çox sayda, dəfələrlə təkrarlanan ardıcıllıqla birləşir. Sonrakı biokimyəvi tədqiqatlar göstərdilər ki, SIR2 zülal *histidin deasetilazad*ır, o histon quyruqlarında lizin qalıqlarından asetil qruplarını uzaqlaşdırır. Daha sonra, RAP1 və SIR2, 3 və 4 zülallar bir-biri ilə birləşirlər və SIR3 ilə SIR4 SIR2-nin deasetilaza fəallığı ilə əsasən asetilləşməmiş vəziyyətdə saxlanılan H3 və H4 histonların N-sonluqlu quyruğuna birləşirlər. Fluoressent konfokal mikroskopiyadan istifadə etməklə maya hüceyrələrinin ya SIR zülalların istənilən biri ilə ya da RAP1 zülalı ilə fluoressent-nişanlanmış anticismlərlə rənglənməsi, və ya nişanlanmış telomer-spesifik DNT probuna hibridləşməsi ilə aparılan bir sıra eksperimentləri aşkar etdi ki, bu zülallar ali eukariotlarda tapılmış heteroxromatinə bənzər çox böyük, kondensasiya olunmuş telomer nukleoprotein quruluşları yaradırlar (Şəkil 9-36a, b, c).

Şəkil 9-36d maya telomerlərində xromatin-vasitəçiliyi ilə susdurmanın bu və digər tədqiqatlara əsaslanan modelini göstərir. Telomerlərdə heteroxromatinin formalaşması, telomerlərin ən uc zonasında nuklesomdan-kənar rayonundakı təkrarlanan ardıcıllıqlara birləşmiş çoxsaylı RAP1 zülallarla başlayır. Telomer-birləşmiş RAP1, üç SIR zülallar (2, 3 və 4) və hipoasetilləşmiş H3 və H4 histonların daxil olduğu zülal-zülal qarşılıqlı əlaqələrin şəbəkəsi bir neçə telomerin daxil olduğu, və DNT-nin kənar zülallara daha çox əlçatmaz olduğu yüksək dərəcəli nukleoprotein kompleksi yaradır. Əlavə bir zülal, SIR1 də cütləşən-tip lokusun susması üçün tələb olunur. O, *HML* ilə *HMR*-i əhatə edən oxşar çoxzülallı susduran kompleksin toplanmasını inisiasiya etmək üçün RAP1 və digər zülallarla birlikdə *HML* və *HMR*-lə assosasiyada olan susduran rayonlara birləşir.

Bu modelin əhəmiyyətli xüsusiyyəti odur ki, histon quyruqların *hiperasetilləşməsi* repressiyadan asılıdır. Bu asılılıq N-sonluğunda lizin qalıqlarının argininlər, qlutaminlər və ya qlisinlərlə əvəz olunduğu histonları ekspressiya edən maya mutantları ilə aparılan eksperimentlərdə nümayiş etdirilmişdir. Arginin lizin kimi müsbət yüklənmişdir, amma asetilləşə bilmir. Digər tərəfdən, qlutamin neytraldır və asetilləşmiş lizinin neytral yükünü stimullaşdırır və yan zəncirə malik olmayan qlisin də özünü müsbət yüklənmiş lizinin olmadığı kimi aparır. Repressiya telomerlərdə və susan cütləşmə-tipli lokuslarda qlutamin və qlisinin lizinlə əvəz olunduğu mutantlarda qüsurlu olmuşdur, amma argininlə əvəz olunan mutantlarda qüsurlu olmamışdır. H3 və H4 hstonlarda lizinin daha da asetilləşməsi Sir3 və Sir4-ün birləşməsinə mane olur və nəticədə susan lokusda və telimerlərdə repressiyayanın qarşısını alır. Nəhayət, histonun N-sonluqlu quyruğunun (Şəkil 8-26a) xüsusi bir mövqeyində asetilləşmiş lizinə spesifik olan anticismlərdən istifadə etməklə aparılan xromatin immunçökdürmə eksperimentləri (Şəkil 9-18a) təsdiq etdi ki, histonlar telomerlər yaxınlığında repressiya olunmuş rayonlarda və susan cütləşən-tipli lokuslarda hipoasetilləşirlər, amma genlər bu rayonda derepresssiya olunduqda, onlar *sir* mutantlarda hiperasetilləşmiş olurlar.

Repressorlar Histon Deasetilləşməsini Spesifik Genlərdə Yönəldə Bilirlər

Xromatin vasitəsilə gen repressiyasında *histon deasetilləşməsinin* əhəmiyyəti, daxili xromosomal mövqelərdə genləri tənzimləyən eukariotik repressorların öyrənilməsi tədqiqatları ilə dəstəklənir. Artıq məlumdur ki, bu zülallar repressiya etdikləri genlərdə TATA boksu və prpomotor-proksomal rayonu əhatə edən nukleosomlarda histon quyruqlarının deasetilləşməsinə səbəb olmaqla fəaliyyət göstərirlər. In vitro tədqiqatlar göstərdi ki, promotor DNT asetilləşməmiş histonları olan nukleosomun bir hissəsi olduqda əsas transkripsiya faktorları TATA boksa və promotor-proksimal rayona birləşə bilmirlər. Asetilləşməmiş histonlarda N-sonluq lizinlər müsbət yüklənirlər və DNT fosfatları ilə əlaqəyə girə bilirlər. Asetilləşməmiş histon quyruqlar qonşuluqdakı histon oktamerlərlə və xromatinlə-assosasiyalı başqa zülallarla da qarşılıqlı təsirə girirlər və xromatinin kondensasiya olunmuş, hələ də konformasiyası tam başa düşülməyən yüksək dərəcəli-quruluşda bükülməsinə kömək edirlər. Xalis təsir ondan ibarətdir ki, əsas transkripsiya faktorları hiperasetilləşmiş histonlarla birləşən promotordakı preinisiasiya kompleksində toplana bilmirlər. Əksinə, əsas transkripsiya faktorlarının birləşməsi, müsbət yüklənmiş lizin qalıqlarının neytrallaşdırıldığı və elektrostatik qarşılıqlı əlaqənin aradan qaldırıldığı hiperasetilləşmiş histon quyruqlarla daha az repressiya olunur.

Histon deasetilləşməsi ilə transkripsiyanın xüsusi maya promoterlərində repressiyası arasında əlaqə, insanın *histon deasetilazasını* kodlaşdıran kDNT-nin, çoxsaylı maya genlərinin normal repressiyasında tələb olunduğu məlum olan maya RPD3 gen ilə yüksək homologiyaya malik olduğu aşkar olunanda aydın olmuşdur. Sonrakı işlər göstərdi ki, RPD3 zülal

histon deasetilaza fəallığına malikdir. RPD3-ün bir sıra promotorlarda histonları deasetilləşdirmə qabiliyyəti iki başqa zülaldan: yuxarıya istiqamətdə spesifik tənzimləyici ardıcıllığa (URS1) birləşən Ume6 repressor zülaldan, və Rpd3L adlanan, tərkibində Rpd3-ə malik olan multizülal kompleksin bir hissəsi olan SIN3 zülaldan asılıdır (bax Şəkil 9-37a). Sin3 həmçinin Ume6-nın repressiya domeninə birləşir və beləliklə, Rpd3 histon deasetilazanın kompleksdə yerini müəyyən edir, belə ki, o yaxınlıqdakı promotorla-assosasiyada olan nukleosomlarla əlaqə yarada bilsin və histon quyruğundakı lizin qalıqlarından asetil qruplarını uzaqlaşdıra bilsin. Şəkil 9-18a-da təsvir olunan xromatin immunçökdürmə metodu ilə və asetilləşmiş histon lizinlərinə spesifik olan anticismlərlə aparılan əlavə eksperimentlər göstərdilər ki, təbii formalı mayada Ume6-birləşmə saytının birbaşa yaxınlığında bir və ya iki nukleosom hipoasetilləşirlər. Bu sayta Ume6 ilə repressiya olunan genlərin promotorları daxildir. *sin3* və *rpd3* silinmiş mutantlarda yalnız promotorlar derepressiya olunmamışdır, eyni zamanda Ume6-birləşmə saytına yaxın olan nukleosomlar hiperasetilləşmişdirlər. Bütün bu tapıntılar, Şəkil 7-36a-da göstərilmiş repressorla-istiqamətlənən deasetilləşmə modelini əhəmiyyətli dərəcədə sübutlarla təmin edir.

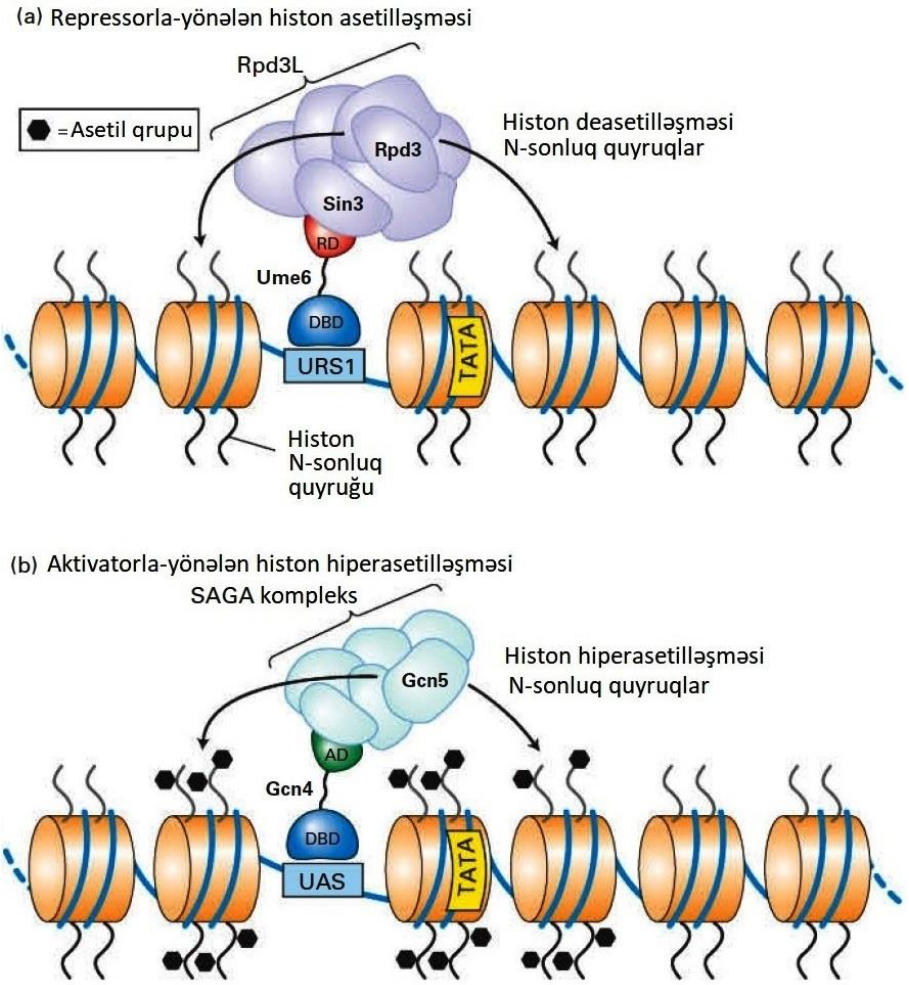
Mayada Sin3-Rpd3 kompleksi (Rpd3L) ko-repressor kimi fəaliyyət göstərir, repressiya domeninə birləşən zülal və ya zülallar kompleksi transkripsiyanı repressiya etmək üçün xromatinlə, Pol II ilə və əsas transktripsiya faktorları ilə qarşılıqlı əlaqəyə girir. Histon deasetilazaya malik olan ko-repressor komplekslərn çoxsaylı repressorlarla birləşdiyi məməlilərin hüceyrələrində də aşkar olunmuşdur. Bu komplekslərdən bəziləri Sin3-ün məməlilərdə olan homoloquna (mSin3) malikdir və bunlar mayada olduğu kimi, repressorların repressiya domeni ilə qarşılıqlı əlaqə olur. Məməlilərin hüceyrələrində identifikasiya olunan başqa histon deasetilaza kompleksləri əlavə və ya fərqli repressiya domeninə birləşən zülallara malikdirlər. Belə müxtəlif repressorların və ko-repressorların kombinasiyası spesifik promotorlarda mayada olan mexanizmə oxşar mexanizmlə histon deasetilləşməsində mediator rolunu oynayır (bax Şəkil 9-37a). Transkripsiyanın "Qapalı" xromatin quruluşunun yaranması ilə repressiyadan başqa bəzi repressiya domenləri də, təmizlənmiş əsas transkripsiya faktorları ilə in vitro aparılmış eksperimentlərdə histonlar olmayan şəraitdə preinisiasiya kompleksinin toplanmasını ingibirləşdirir. Bu fəallıq yəqin ki, transkripsiyanın bu repressiya domenləri ilə in vivo repressiyasına da kömək edir.

Aktivatorlar Histon Asetilləşməsini Xüsusi Genlərdə Yönəldə Bilirlər

Repressorlar onların repressiya domeninə birləşən ko-repressorlar vasitəsi ilə fəaliyyət göstərdiyi kimi, DNT-birləşdirən aktivatorlar transkripsiyanı fəallaşdırmaq üçün, xromatinlə əlaqəyə girərək onu modifikasiya edən zülal kompleksi ilə, Pol II və ya əsas transkripsiya faktorları ilə əlaqəyə girərərk çoxsubvahidli ko-aktivator komplekslərə birləşməklə fəaliyyət göstərirlər. İlk ətraflı öyrənilmiş ko-aktivatorlardan biri, Bölmə 9-4-də təsvir olunmuş Gcn4 aktivator zülalla fəaliyyət göstərən maya *SAGA kompleksi* olmuşdur. İlkin genetik tədqiqatlar göstərmişdir ki, Gcn4 aktivatorun tam fəallığı üçün Gcn5 adlanan zülalın olması tələb olunur. Gcn5-in fəaliyyəti barədə ilk dəlil, ilk təmizlənmiş *histon asetilaza* olan, protozoa *Tetrahymena*-dan təmizlənmiş histon asetilazanın biokimyəvi tədqiqatlarından alınmışdır. Ardıcıllıq analizləri, *Tetrahymena* zülalı ilə maya Gcn5 arasında homologiyanı aşkar etdi və tezliklə histon asetilaza fəallığının olduğu da aşkar olundu. Daha sonrakı genetik və biokimyəvi tədqiqatlar aşkar etdi ki Gcn5 çoxzülallı ko-aktivator kompleksin bir subvahididir, bu subvahidlərdən bəzilərini kodlaşdıran genlərin adı ilə SAGA kompleks adlandırılmışdır. Bu histon asetilaza kompleksinin başqa subvahidi, Gcn4 də daxil olmaqla çoxsaylı maya aktivator zülalların fəallaşdırma domeninlərinə birləşir. Şəkil 9-37b-də göstərilən model, Gcn4 aktivatorla tənzimlənən genin promoter rayonu yaxınlığındakı nukleosomların, hüceyrənin histonlarının əksəriyyəti ilə müqayisədə xüsusən hiperasetilləşməsi müşahidələri ilə tam uyğundur. Promoter rayonu yaxınlığında nukleosomların aktivatorla-istiqamətlənən bu hiperasetilləşməsi xromatin quruluşunu açaraq transkripsiyanın inisiasiyası üçün tələb olunan başqa zülalların birləşməsinə imkan yaradır. Xromatinin quruluşu, onun ayrılmış nüvədə nukleazalarla parçalanmaya həssaslığına görə xromatinin əksər hissəsi ilə müqayisədə az kondensasiya olunmuşdur.

Xromatinin dekondensasiyasından başqa spesifik histon lizinlərinin asetilləşməsi, onlara birləşən *bromodomenə* malik olan zülallar üçün birləşmə saytlarını yaradır. Bromedomen təxminən 110 amin turşusu qalığından ibarət olan ardıcıllıq olub asetilləşmiş lizinə birləşən domendə bükülür. Bir və ya daha artıq bromodomen transkripsiyanın fəallaşmasında töhfəsi olan bir sıra xromosom-assosasiyalı zülallarda tapılmışdır. Məsələn, əsas transkripsiya faktoru TFIID-nin, yüksək afinliklə asetilləşmiş nukleosomlara birləşən subvahidi iki bromodomenə malikdir. Xatırladaq ki, TFIID-nin promotora birləşməsi RNT polimeraza II preinisiasiya kompleksinin toplanmasını inisiasiya edir (bax Şəkil 9-19). Virtual olaraq bütün fəal genlərin promotor rayonlarındakı nukleosomlar onlardakı H3 və H4 histon quyruqlarının lizin qalığında hiperasetilləşmişlər.

Ali eukariotlarda da oxşar fəallaşdırma mexanizmi fəaliyyət göstərir. Məməlilərin hüceyrələri, mayadakı SAGA kompleksə homoloji olan çoxsubvahidli histon asetilaza ko-aktivator kompleksinə malikdir. Onlar həmçinin, iki yaxın olan, təxminən 300-kDa çəkili və oxşar funksiyaya malik olan, *CBP* və *P300* adlanan çoxdomenli zülalları ekspressiya edirlər. Əvvəldə qeyd olunduğu kimi, CBP-nin bir domeni CREB transkripsiya faktorunda fosforlaşmış turş fəallaşdırıcı domenə birləşir. CBP-nin başqa domenləri başqa aktivatorlarda fərqli fəallaşdırıcı domenlərlə qarşılıqlı əlaqəyə girirlər. CBP-nin başqa domeni də histon asetilaza fəallığına malikdir və başqa bir CBP domeni əlavə, çoxsubvahidli histon asetilaza kompleksinə birləşmiş olur. CREB və məməlilərin çoxsaylı başqa aktivatorları CBP və birləşmiş histon asetilaza kompleksini spesifik nukleosomlara qismən istiqamətləndirməklə fəaliyyət göstərirlər, burada onlar histon quyruqlarını asetilləşdirir və əsas transkripsiya faktorlarının promotor DNT-si ilə qarşılıqlı əlaqəsinə şərait yaradırlar.

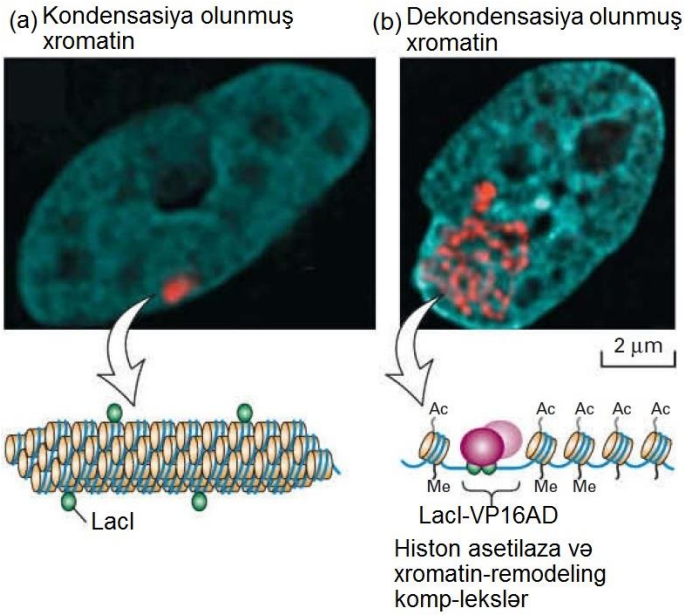


ŞƏKİL 9-37 Mayada transkripsiya nəzarət olunmasında histon deasetilləşməsi və hiperasetilləşməsinin ehtimal olunan mexanizmi. (a) Histon N-sonluq quyruqların repressorla-istiqamətlənmiş deasetilləşməsi. Ume6 repressorun DNT-birləşdirən domeni (DBD) genlərin onları tənzimləyən spesifik yuxarıya istiqamətdə nəzarət elementi (specific upstream control element- URS1) ilə qarşılıqlı təsirə girir. Ume6 repressiya domeni (RD), histon deasetilaza Rpd3-ün daxil olduğu multizülal kompleksin subvahidi Sin3-ə birləşir. Ume6-birləşmə saytı rayonunda nukleosomlarda histon N-sonluğu quyruğun deasetilləşməsi əsas transkripsiya faktorlarının TATA boksda birləşməsini ingibirləşdirir, bununla da genin ekspressiyasını repressiya edir. (b) Histon N-sonluq quyruğunun aktivatorla-istiqamətlənən hiperasetilləşməsi. Gcn4 aktivatorun DNT-birləşdirən domeni tənzimlədiyi genin yuxarıya istiqamətdə spesifik fəallaşdırıcı ardıcıllığı (upstream activating sequence – UAS) ilə qarşılıqlı əlaqəyə girir. Gcn4 fəallaşdırıcı domen (AD) sonra, Gcn5 katalitik subvahidin daxil olduğu multizülal histon asetilaza kompleksi ilə əlaqəyə girir. Gcn4-birləşmə saytına birbaşa yaxın olan nukleosomlarda histon N-sonluq quyruğun sonrakı hiperasetilləşməsi inisiasiya üçün tələb olunan əsas transkripsiya faktorlarının əldə olunmasını mümkün edir. Ali eukariotlarda çox genlərin repressiyası və fəallaşması oxşar mexanizmlə baş verir.

Xromatin-Remodelinq Faktorları Transkripsiyanın Fəallaşmasına və Repressiyasına Kömək Edir.

Çox promotorların fəallaşması üçün histon asetilaza kompleksi ilə yanaşı multizülal xromatin-remodelinq kompleksi də tələb olunur. Bu komplekslərdən ilk xarakterizə olunanı maya SWI/SNF xromatin-remodelinq kompleksidir. SWI/SNF subvahidlərindən biri, ATP hidrolizinin enerjisindən istifadə edərək nuklein turşularının əsas-cütləri arasında və ya nuklein turşuları ilə zülallar arasında qarşılıqlı əlaqəni kəsən ferment DNT helikaza ilə homologiyaya malikdir. Belə güman olunur ki, in vitro SWI/SNF kompleksi DNT-ni nukleosomlara nasos kimi elə vurur və ya itələyir ki, histon oktamerin səthinə birləşmiş DNT səthdən müvəqqəti olaraq ayrılır (dissosasiya edir) və yerini dəyişir, nukleosomların DNT boyunca "sürüşməsinə" səbəb olur. Bu cürə xromatin remodelinqin son nəticəsi transkripsiya faktorlarının xromatində spesifik DNT ardıcıllığına birləşməsinə imkan yaradılmasıdır. Çox fəallaşdırma domemləri ***xromatin-remodelinq kompleksə*** birləşirlər və bu birləşmə DNT-nin histon oktamerlərlə assosasiya etdiyi xromatin templeytdən in vitro transkripsiyanı stimullaşdırır. Beləliklə, SWI/SNF kompleksi başqa tip ko-aktivator kompleksi təmsil edir. Şəkil 9-38-də təsvir olunmuş eksperiment, fəallaşdırma domenin xromatin rayonunu necə dekondensasiya etdiyini dramatik olaraq göstərir. Bu dekondensasiya fəallaşdırma domeninin xromatin-remodelinq və histon asetilaza kompleksləri ilə assosasiyası nəticəsində alınır.

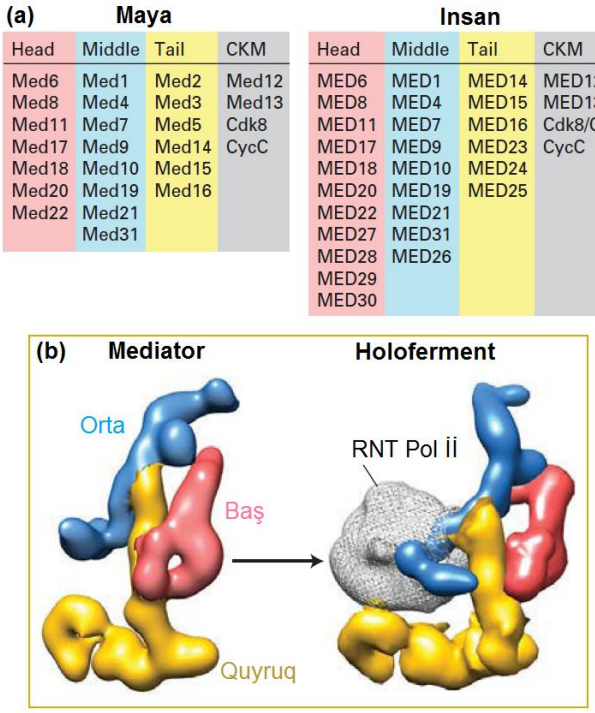
Xromatin-remodelinq kompleksləri, eukariotik hüceyrələrdə DNT-nin daxil olduğu çox proseslərdə, o cümlədən transkripsiyaya nəzarətdə, DNT repliksiyasında, rekombinasiyada və DNT reparasiyasında tələb olunur. Eukariot hüceyrələrdə bir neçə tip xromatin-remodeling kompleksi tapılmışdır və bunların hamısı homoloji DNT helikaza domeninə malikdirlər. Çoxhüceyrəli orqanizmlərdə SWI/SNF komplekslər və buna yaxın olan xromatin-remodelinq kompleksləri, asetilləşmiş histon quyruğuna birləşən homeodomeni olan subvahidlərə malikdirlər. Ona görə də, SWI/SNF komplekslər fəallaşmış və asetilləşmiş xromatin rayonları ilə birləşmiş vəziyyətdə olurlar və yəqin ki, onun dekondensasiya olunmuş konformasiyasını təmin edirlər. Xromatin-remodelinq kompleksləri transkripsiyanın repressiyasında da iştirak eedirlər. Bu xromatin-remodeling kompleksləri repressorlardakı tramskripsiyanın repressiyası domeninə birləşirlər və çox güman ki, xromatinin kondensasiya olunmuş quruluşda bükülməsini həyata keçirməklə repressiyaya kömək edirlər. Genlərin ekspressiyasına və başa proseslərə təsir etmək üçün zülalların belə bir əhəmiyyətli sinifinin, xromatinin quruluşunu necə dəyişməsi barədə hələ çox şeylər öyrənilməmişdir



ŞƏKİL 9-38 Qovşaq zülalların ekspressiyası, fəallaşdırma domeninə cavab olaraq xromatin dekondensasiyasını nümayiş etdirir. Dağsiçanının kultura olunmuş hüceyrə xətti, heteroxromatin rayonunda xromosoma inteqrasiya edən *E. coli lac* operator ardıcıllığının tandem sırasının çoxsaylı nüxsələrinə malik olmaq üçün yaradılmışdır. (a) *lac* repressor üçün olan ekspressiya vektoru (LacI) bu hüceyrələrə keçirilərkən *lac* operator saytlarına birləşən *lac* repressor, *lac* repressora-spesifik anticismdən istifadə (*qırmızı*) etməklə kondensasiya olunmuş xromatində vizuallaşdırıla bilər. DNT, nüvəni aşkar edən DAPI (*mavi*) ilə boyamaqla vizuallaşdırılmışdır. (b) LacI fəallaşdırma domeninə qovşaq olunduqda o hüceyrələrə transfeksiya olundu, (a)-da olduğu kimi boyama aşkar etdi ki, fəallaşdırma domeni xromatininin bu rayonunun, nüvənin daha böyük həcmini dolduran nazik xromatin liflərinə dekondensasiya olunmasına səbəb olur. Dekondensasiya olunmuş xromatin rayonun VIP16 fəallaşdırma domeninə qovşaq olunmuş LacI (AD) ilə və assossasiayda olan xromatin remodelinqi və histon asetilaza kompleksi ilə diaqramı aşağıda göstərilir. [Fotolar Nəzakətlə, Andrew S. Belmont et al., 1999, *J. Cell Biol*. **145**:1341-1354. doi:10.1083/jcb.145.7.1341.]

Pioner Trnskripsiya Faktorları Hüceyrə Differensasiyası Zamanı Gen Fəallaşması Prosesini İnisiasiya Edirlər

Hüceyrələr embriogenez zamanı differensasiya etdiyindən və yetkin orqanizmlərdə sütun hüceyrələrdən differensasiya etdiyindən (bax Fəsil 21), prosesin gedişində induksiya olunan çox genlər ilkin olaraq differensasiya olunmamış əcdad hüceyrələrdə heteroxromatinin repressiya olunan rayonlarında yerləşirlər. Bu genlərin fəallaşması tələb edir ki, onların transkripsiya nəzarət rayonunda xromatinin ətraf mühiti dekondensasiya olunmuş olsun ki, transkripsiya faktorları enhənserlərə və promotor-proksimal nəzarət elementlərinə birləşə bilsinlər, həmçinin əsas transkripsiya faktorları ilə Pol II promotora birləşə bilsinlər. Çox hallarda bu dekondensasiya xüsusi ***pioner transkripsiya faktorları*** tərəfindən inisiasiya olunur, bu faktorlar DNT-də öz doğma saytlarına hətta xromatinin repressiya olunan heteroxromatin rayonunda olduqda belə birləşə bilirlər. Bu faktorlar, bakteriofaq 434 repressorda olduğu üslubda (bax Şəkil 9-29) DNT spiralının bir tərəfinə birləşən DNT birləşdirmə domenə malikdirlər. Bu domen bu faktorlara imkan verir ki, hətta DNT histon oktamerlərlə büküldüyü halda histon səthinin əks tərəfində DNT-yə birləşsinlər.



ŞƏKİL 9-39 İnsanın və mayanın Mediator kompleksinin quruluşu. (a) *S. cerevisiae* və insanın Mediator kompleksi. Mediatorun baş, orta və quyruq modullarını əmələ gətirən subvahidlər göstərilir, eləcə də bəzi Mediator komplekslərlə assosasiya edən CDK-8 kinazanın subvahidlərinin modulu (CKM) Pol II-nin birləşməsini blok edir. (b) Maya Mediatorun CKM-siz krioelekton mikroskopik quruluşu. (*Solda*) Yuxarıda sadalanan subvahidlərdən təşkil olunmuş baş, orta və quyruq modulları rənglə kodlaşdırılmışdır. (*Sağda*) Mediatorun Pol II ilə holoferment adlanın kompleksinin quruluşu göstərir ki, Mediator modulları Pol II-nin birləşməsi səthini yaratmaq üçün bir-birinə nisbətdə fırlanırlar. [(b) hissəsi Elsevier-in razılığı ilə Tsai, K.L., "Subunit architecture and functional modular rearrangements of the transcriptional mediator complex," *Cell*, 2014,**157**(6):1430–1444-dan yenidən çap olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc vasitəsilə alınmışdır.]

Transkripsiyanın fəallaşması prosesini inisiasiya edən pioner transkripsiya faktorlarının bir nümunəsi hepatositlər tərəfindən qana ifraz olunan və qan zərdabının əsas tərkib hissəsini təşkil edən qan zərdabı albuminini kodlaşdıran qarciyər-spesifik gen *Alb1*-dir. İnkişaf edən siçanda FoxA və GATA-4 və ya GATA-6 transkripsiya faktorları, qaraciyərin inkişafına yönəldilən, differensasiya etməmiş bağırsaq epidermal hüceyrələrində *Alb1* enhanserə birləşən birinci transkripsiya faktorlarıdır. FoxA "qanadlı spiral" DNT-birləşdirən domenə malikdir və FoxA-birləşmə saytına malik olan DNT spiralının bir tərəfinə birləşir. GATA faktorları da həmçinin DNT-də öz spesifik saytlarına birləşmə qabliyyətinə,

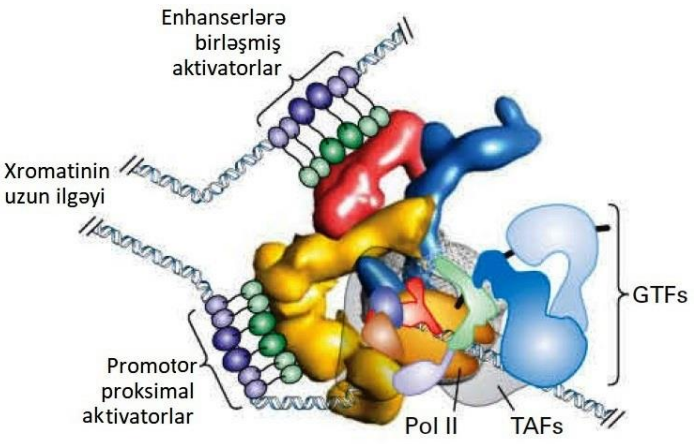
hətta bu saytlar histon oktamerlərlə bükülmüş nukleosomlar daxilində olduqda belə malikdirlər. Daha sonra, FoxA və GATA-4/6 fəallaşdırma domenləri 120-əc *Alb1* enhanser xromatini dekondensasiya etmək üçün xromatin remodeling kompleksləri ilə və histon asetilaza kompleksləri ilə qarşılıqlı əlaqəyə girə bilir, bu da inkişaf etməldə olan qaraciyər tumurcuğunda müşahidə olunan dörd əlavə transkripsiya faktorlarının sonrakı birləşməsinə imkan yaradır.

Mediator Kompleks Fəallaşdırma Domenləri ilə Poli II Arasında Molekulyar Körpünü Yaradırlar

Fəallaşdırma domeninin histon asetilaza kompleksləri və xromatin-remodelinq kompleksləri ilə qarşılıqlı əlaqəsi promotor rayonunda xromatini əsas transkripsiya faktorlarının birləşməsinə imkan verən "açıq" xromatin quruluşuna çevirdikdən sonra, fəallaşdırma domeni başqa bir çoxsubvahidli ko-aktivator komplekslə, Mediator komplekslə əlaqəyə girir (Şəkil 9-39). Fəallaşdırma domeni-Mediator qarşılıqlı əlaqələri promotor üzərində preinisiasiya kompleksinin toplanmasını stimullaşdırır. Son zamanların krioelektron mikroskopiya tədqiqatları göstərdi ki, Mediator kompleksin baş və orta domenləri Pol II ilə əlaqəyə girir. Bir sıra mediator subvahidləri müxtəlif aktivator zülallarda fəallaşdırma domeninə birləşirlər. Beləliklə, Mediatir, DNT-də öz doğma saytına birləşmiş aktivatorla promotordakı Pol II arasında molekulyar körpünü yarada bilir.

Temperatura-həssas maya mutantları ilə aparılan eksperimentlər göstərdi ki, bəzi Mediator subvahidlər virtual olaraq bütün maya genlərinin transkripsiyası üçün tələb olunur. Bu subvahidlər, Mediator kompleksinin ümumi quruluşunun qorunub saxlanılmasına kömək edir və ya Pol II-yə birləşir, ona görə də onların bütün aktivatorlarla fəallaşmada iştirakı tələb olunur. Bunun əksinə, başqa Mediator subvahidlər genlərin spesifik yarımqruplarının normal fəallaşması və ya repressiyası üçün tələb olunurlar. Qeyri zəruri Mediator subvahidlərin qüsurlu olduğu mutantlarda maya gen ekspressiyasının DNT mikroarray analizləri (bax Şəkil 6-26) göstərdi ki, hər bir belə subvahid bütün genlərin 3-10 faizinin transkripsiyasına o dərəcədə təsir edir ki, onun silinməsi (delesiyası) faktorlarla mRNT ekspressiyasını iki dəfə və ya daha artıq dərəcədə artırır və ya azaldır. Aşkar edilmişdir ki, çox hallarda bu mediator subvahidləri xüsusi fəallaşdırıcı domenlərlə qarşılıqlı əlaqədə olur; beləliklə, bir subvahid qüsurlu olanda, bu subvahidə birləşən aktivatorlarla tənzimlənən genin transkripsiyası güclü şəkildə depressiya olunur, amma başqa genlərin transkripsiyasına təsir olunmur. Son zamanların tədqiqatları göstərir ki, fəallaşdırıcı domenlər Mediatorla qarşılıqlı əlaqədə olduqda, Şəkil 9-39-da göstərilən baş, orta və quyruq domenlər bir-birinə nisbətdə fırlanırlar, RNT Pol II üçün birləşmə səthini yaradırlar. Preinisiasiya kompleksində əsas transkripsiya faktorları ilə əlaqə yaradan polimerazanın səthi (bax Şəkil 9-20) polimeraza-Mediator kompleksinin ***holoferment*** adlanan irəli sürülmüş modelində açıq vəziyyətdə qalır.

Fərdi Mediator subvahidlərin spesifik fəallaşdırma domeninə birləşdiyini göstərən müxtəlif eksperimental tədqiqatların nəticələri göstərir ki, çoxsaylı aktivatorlar eyni vaxtda və ya sürətli ardıcıllıqla Mediator komplekslə qarşılıqlı əlaqəyə girərəkl tək bir promotordan transkripsiyaya təsir edə bilir (Şəkil 9-40). Enhanserlərə və ya promoter-proksimal elementlərə birləşmiş aktivatorlar promotorla birləşmiş Mediatorla qarşılıqlı əlaqədə ola bilər, çünki xromatin, DNT kimi əyiləndir və tənzimləyici rayonlarla promotoru *E. coli*-nin NtrC aktivatoru və σ^{54}-RNT polimerazada müşahidə olunduğu kimi, bir-birinə yaxınlaşdıran ilgək əmələ gətirir (bax Şəkil 9-5). Eukariot promotorları təşkil edən çoxzülallı nukleoprotein komplekslər, ribosomlar kimi çox böyük olub ümumi kütləsi təxminən 3-5 meqadaltona (MDa) bərabər olan 100-dən artıq zülaldan təşkil olunmuşlar.



ŞƏKİL 9-40 Tək Mediator komplekslə əlaqədə olan bir sıra DNT-birləşdirən aktivatorların modeli. Fərqli Mediator subvahidlərinin xüsusi fəallaşdırma domeni ilə qarşılıqlı təsiri tək bir promotorda bir sıra aktivatorlardan olan siqnalların inteqrasiyasına öz töhfəsini verə bilir. Müzakirə üçün tekstə bax.

Promotorda preinisiasiya kompleksinin in vivo toplanması və transkripsiyanın inisiasiyası yüksək dərəcədə olan kooperativ proses olub əsasən tələb edir ki, transkripsiya-nəzarət elementlərinə birləşmiş bir sıra transkripsiya faktorları ko-aktivatorlarla qarşılıqlı əlaqədə olsunlar, onlar isə öz növbəsində Pol II və əsas transkripsiya faktorları ilə qarşılıqlı əlaqədə olsunlar. Hüceyrə xüsusi bir geni ekspressiya etmək üçün o genin transkripsiyası üçün tələb olunan aktivatorların xüsusi dəstini istehsal etməlidir.

9.5 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Transkripsiyanın Repressiyasının və Fəallaşmasının Molekulyar Mexanizmləri

- Eukariot transkripsiya aktivatorları və repressorları öz təsirlərini əsasən xromatinin quruluşunda modulyasiya (dəyişiklik) etməklə və ya Pol II ilə və əsas transktipsiya fakrorları ilə əlaqədə olmaqla preinisiasiya kompleksinin toplanmasına təsir edən çoxsubvahidli ko-aktivatorlara və ya ko-repressorlara birləşməklə göstərirlər.
- DNT xromatinin kondensasiya olunmuş rayonlarında (heteroxromatin) transkripsiya faktorları və başqa zülallar

üçün nisbətən əlçatmazdır, beləliklə bu rayonlarda gen ekspressiyası repressiya olunur.

- Bir sıra zülalların bir-biri ilə və histon H3 və H4-ün hiperasetilləşmiş N-sonluq quyruğu ilə qarşılıqlı əlaqəsi *S. cerevisiae*-də telomerlərdə və susan cütləşmə-tipi lokuslarında baş verən transkripsiyanın xromatinlə-vasitəsilə repressiyasına səbəb olur (bax Şəkil 9-36).
- Bəzi repressiya domenləri histon deasetilaza komplekslərindən ibarət olan ko-aktivatorla əlaqə yaradaraq fəaliyyət göstərir. Repressorun-birləşmə saytı yaxınlığında nukleosomlarda histon N-sonluqlu quyruqların sonrakı deasetilləşməsi promotor DNT ilə əsas transkripsiya faktorları arasında əlaqəni ingibirləşdirməklə transkripsiyanın inisiasiyasını repressiya edir (bax Şəkil 9-367a).
- Fəallaşdırma domenləri multizülal histon asetilaza kimi ko-aktivator komplekslərə birləşməklə fəaliyyət göstərirlər. Aktivatorun-birləşmə saytı yaxınlığında nukleosomlarda histon N-sonluqlu quyruqların sonrakı hiperasetilləşməsi promoter DNT ilə əsas transkripsiya faktorları arasında əlaqəni mümkün etməklə transkripsiyanın inisiasiyasını stimullaşdırır (bax Şəkil 9-37b).
- SWI/SNF xromatin remodelinq factorları başqa tip ko-aktivatoru təşkil edirlər. Bu çoxsubvahidli komplekslər, ATP-dən asılı olan reaksiya ilə DNT-ni histon özəkdən müvəqqəti dissosasiya edə bilir, həmçinin xromatin rayonlarını dekondensasiya edə bilir və beləliklə bəzi promotorlarda inisiasiyanın baş verməsi üçün lazım olan DNT-birləşdirən zülalların birləşməsinə imkan yaradır.
- Ko-aktivatorların başqa tipi olan Mediator kompleksi təxminən 30-subvahidin kompleksindən ibarət olub, birbaşa polimeraza və fəallaşdırıcı domenlərə birləşməklə fəallaşdırma domenləri ilə RNT polimeraza II arasında molekulyar körpünü əmələ gətirir. Mediator, eyni zamanda bir sıra müxtəlif aktivatorlara birləşməklə çoxsaylı aktivatorların təsirinin tək bir promotora inteqrasiya etməsinə kömək edir (bax Şəkil 9-40).
- Uzaq enhanserə birləşən aktivatorlar promotora birləşmiş transkripsiya faktorları ilə əlaqə yarada bilir, çünki xromatin elastikdir (əyiləndir) və aradakı xromatin böyük ilgək əmələ gətirə bilir.
- Preinisiasiya komplekslərinin yüksək dərəcədə in vivo kooperativ toplanması əsasən bir neçə aktivatoru tələb edir. Hüceyrə xüsusi bir geni ekspressiya etmək üçün bu genin transkripsiyası üçün tələb olunan aktivatorların xüsusi dəstini yaratmalıdır.

9.6 Transkripsiya-Faktorları Fəallığının Tənzimlənməsi

Biz əvvəlki müzakirələrdə DNT-nin xüsusy tənzimləyici ardıcıllıqlarına birləşən aktivator və repressorların kombinasiyalarının eukariot genlərin transkripsiyasına necə nəzarət etdiklərini gördük. Çoxhüceyrəli orqanizmlərdə spesifik genlərin xüsusi hüceyrələrdə xüsusi zamanda ekspressiya olunub olunmaması yüksək dərəcədə nüvə qatılığının və bu genin tənzimləyici ardıcıllıqlarına birləşən transkripsiya faktorlarının fəaliyyətinin nəticəsdiir. (İstisnalar, növbəti bölmədə müzakirə olunan *epigenetik* mexanizmlər nəticəsində yaranan "transkripsiya yaddaşı"na görədir.) Xüsusi hüceyrə tipində hansı transkripsiya faktorlarının ekspressiya olunduğu və nə qədər istehsal olunduğu inkişaf prosesində və hüceyrə tipinin differensasiyası zamanı meydana gələn transkripsiya faktorları ilə transkripsiya faktorlarını kodlaşdıran genlərin nəzarət rayonları arasındakı çoxsaylı tənzimləyici qarşılıqlı əlaqələrlə müəyyən olunur. DN-aza I hiperhəssaslığı saytının identifikasiyası yolu ilə transkripsiya-faktorları-birləşmə saytlarının genom səviyyəsində analizindəki son vaxtların nailliyyətləri bizə insanın çoxsaylı hüceyrə tiplərində inkişafın gedişi və differensasiya zamanı transkripsiya-faktoru birləşməsinin dəyişilməsinin ilk yüksək rezolyusiyalı görünüşünü verdi.

DN-aza I Hiperhəssas Saytlar Hüceyrə Differensasiyasının İnkişaf Tarixini Əks Etdirir

Biz Fəsil 8-də öyrəndik ki, ekspressiya olunan gen bu genin ekspressiya olunmadığı digər hüceyrə tiplərinə misbətən DN-aza I (inəyin mədəaltı vəz fermenti) ilə doğranmaya daha çox həssasdır (bax Şəkil 8-34). Uzun rayonlarda DN-aza I-in həssaslığındakı bu ümumi yüksəlmədən başqa, təqdiqatçılar sonralar tapdılar ki, genomun uzunluğu 100 əsas cütü qədər olan spesifik qısa rayonları DN-aza I ilə doğranmaya həddən artıq həssasdır və ayrılmış nüvəyə DN-aza I-in aşağı səviyyəsi ilə təsir etdikdə birinci bu rayonlar doğranırlar. Bu saytlar *DN-aza I hiperhəssas saytlar* (*DHS*) adlanır. Yüksək dərəcədə səmərəli ardıcıllıq oxuması metodları çoxsaylı differensasiya olunmuş və embrion hüceyrə tiplərində DHS-lərin genom boyu xəritələnməsinə imkan yaratdı. Qısası, ayırılmış nüvənin aşağı səviyyəli DN-aza I ilə doğranmasından sonra təsir edilmiş xromatindən DNT ayrıldı. Məlum olan ardıcıllıqların oliqonukleotid linkerləri DN-aza I ilə doğranma zamanı yaranan DNT uclarına liqasiya olundu. Sonra DNT sonikasiya yolu ilə kiçik fraqmentlərə ayrıldı, PZR yolu ilə amlifikasiya olundu və ardıcıllığı oxundu. Oliqonukleotid linkerlərin məlum olan ardıcıllıqlarına bitişik olan insan DNT ardıcıllıqları DHS-lər kimi identifikasiya olundu.

Şəkil 9-41a insanın sol tərəfdə göstərilən hüceyrə tiplərinin nümunələrində ardıcıllığı oxunan DHS dəfələrin sayının qrafikini – DNT həssaslığı saytının ölçülməsini göstərir. Xromosom 12-də genomun təxminən 600-kə rayonunun xromosomun sol ucundan 96.2-96.8 Mə məsafədə yerləşdiyi göstərilir. Hər bir şaquli barın hündürlüyü hər bir hüceyrə tipindən ayırılmış nüvədə doğranma mövqeyində DNT ardıcıllığının həssaslıq dərəcəsini göstərir

Spesifik transkripsiya faktorlarının birləşmə saytlarının xromatin immunçökdürmə yolu ilə xəritələşdirilməsi (bax Şəkil 9-18) göstərdi ki, əksər transkripsiya faktoru-birləşmə saytları DHS-lərlə uyğun gəlir. Bu ola bilsin ona görədir ki, birləşmiş transkripsiya faktorunun DNT-birləşdirən domeni birləşmə saytına cinah olan DNT-ni DN-aza I ilə doğranmaq üçün açıq vəziyyətə gətirir və ya ona görə ki, transkripsiya faktoru-fəallaşdırma domeni qonşu nukleosomlarda DNT-nin histon oktamerlərlə əlaqəsinin stabilliyini pozan xromatin-remodelinq komplekslərlə əlaqəyə girir, DNT-ni DN-aza I ilə doğranmaya

daha həssas edir. DHS-lər birləşmiş transkripsiya faktorları ilə uyğun gəldiyindən DHS profili xromatin rayonunda birləşmiş transkrisiya faktorlarının mövqeyini təmsil edir, hərçənd ki, birləşmiş transkripsiya faktorları birbaşa identifikasiya olunmamışdırlar.

Şəkil 9-41a-da DHS verilənlərin təyin edildiyi toxuma tipi solda göstərilmişdir, bu toxuma tiplərinin inkişaf etdiyi embrion toxumaları isə Şəkil 9-41b-də göstərildiyi kimi, rənglə kodlaşdırılmışdır. Aydındır ki, bədənin müxtəlif rayonlarından olan fibroblastlar kimi və ya müxtəlif orqanlarda qan damarlarının daxili səthini örtən endotelial hüceyrələr kimi daha yaxın bağlılığı olan hüceyrə tipləri, daha uzaq bağlılığı olan hüceyrə tiplərinə nisbətə daha çox oxşar DHS-lərə malikdirlər. Kompüter metodları ilə bu hüceyrə tiplərinin hər biri üçün bütün genom boyu DHS-lərin xəritələrinin oxşarlığını müqayisə etmək olar. Bu kompüter metodları ilə bir hüceyrə tipinin DHS xəritəsinin digər tiplərinki ilə necə oxşar olduğunun dendroqramı yaradıla bilər (bax Şəkil 9-41b). Bu dendroqram gen ardıcıllıqlarının yaxınlığını və beləliklə, onların təkamülünü göstərmək üçün istifadə olunan dendroqramlara oxşardır (bax Şəkil 8-28b).

Əhəmiyyətlidir ki, embrion sütun hüceyrələrin DHS modeli bütün hüceyrə növləri üçün DHS dendrogramın kökündə durur (bax Şəkil 9-41b). Bu hüceyrələr, Fəsil 21-də müzakirə olunan (bax Şəkil 21-5), məməlilərin erkən embrionunun daxili hüceyrə kütləsini əmələ gətirir, yetkin orqanizmlərdəki bütün hüceyrələrin əcdadıdır. Embrion sütun hüceyrələri bütün hüceyrələrin ən mürəkkəb transkripsiya nəzarətinə malikdirlər, onlar bir tədqiqatda differensasiya etmiş hüceyrələrlə, 90000-150000, müqayisədə ən çox DHS-lərə, təxminən 257000 malikdirlər. Bu fərq, demək olra ki, embrion sütun hüceyrələrinin inkişaf potensialını əks etdirir. Yetkin differensasiya etmiş hüceyrələrdə müşahidə olunan, təxminən 30 faiz DHS-lər embrion sütun hüceyrələrində də müşahidə edilmişdir, amma hər bir yetkin hüceyrə tipində digər 30 faiz fərqli saxlanılır. Embrion sütun hüceyrələrdə tapılmamış əlavə 50000-100000 qədər yeni DHS-lər inkişafın gedişi müddətində meydana çıxır, amma hər bir hüceyrə tipi daxilində fərqli DHS-lər dəsti yaranır. DHS-lərin bu profili hər bir geni tənzimləyən transkrisiya faktorlarının kombinasiyasının mürəkkəbliyini aşkar edir. Təxminən bir milliona yaxın fərqli DHS-lər Şəkil 9-41-də göstərilən hüceyrə tiplərində xarakterizə olunmuşlar, bunlar göstərir ki orta hesabla, dörd və ya beş enhanserin kombinasiyası insan genomunda təxminən 21000 genin transkripsiyasını tənzimləyir. Bu analizlərə, bütün orqanların ən mürəkkəb orqan sistemi olan mərkəzi sinir sistemi daxil deyildir, ona görə də insan enhanserlərinin ümumi sayı çox-çox böyük ola bilər. Amma, analiz edilən toxumalarda DHS xəritələri erkən embrion transkripsiya faktorları birləşməsinin harada itirildiyini və hüceyrələr embrion sütun hüceyrədən differensasiya edərkən transkripsiya faktorlarının yeni-hüceyrə-tipi-spesifik kombinasiyasının haraya birləşdiyini aşkar etdi. Hətta belə təxminetmə transkripsiya nəzarətinin mürəkkəbliyini tuta bilmir, çünki tək bir DHS kimi aşkar edilən çox transkrisiya-faktoru-birləşmə saytları fərqli hüceyrə tiplərində fərqli yaxınlığa malik olan transkripsiya faktorları tərəfindən birləşir. Çox hallarda, fərqli yaxınlığı (oxşarlığı) olan transkripsiya falktorları müxtəlif hüceyrə tiplərində transkripsiyanı həmin hüceyrə tiplərinə müvafiq səviyyədə tənzimləmək üçün eyni transkripsiya-nəzarət rayonuna birləşirlər

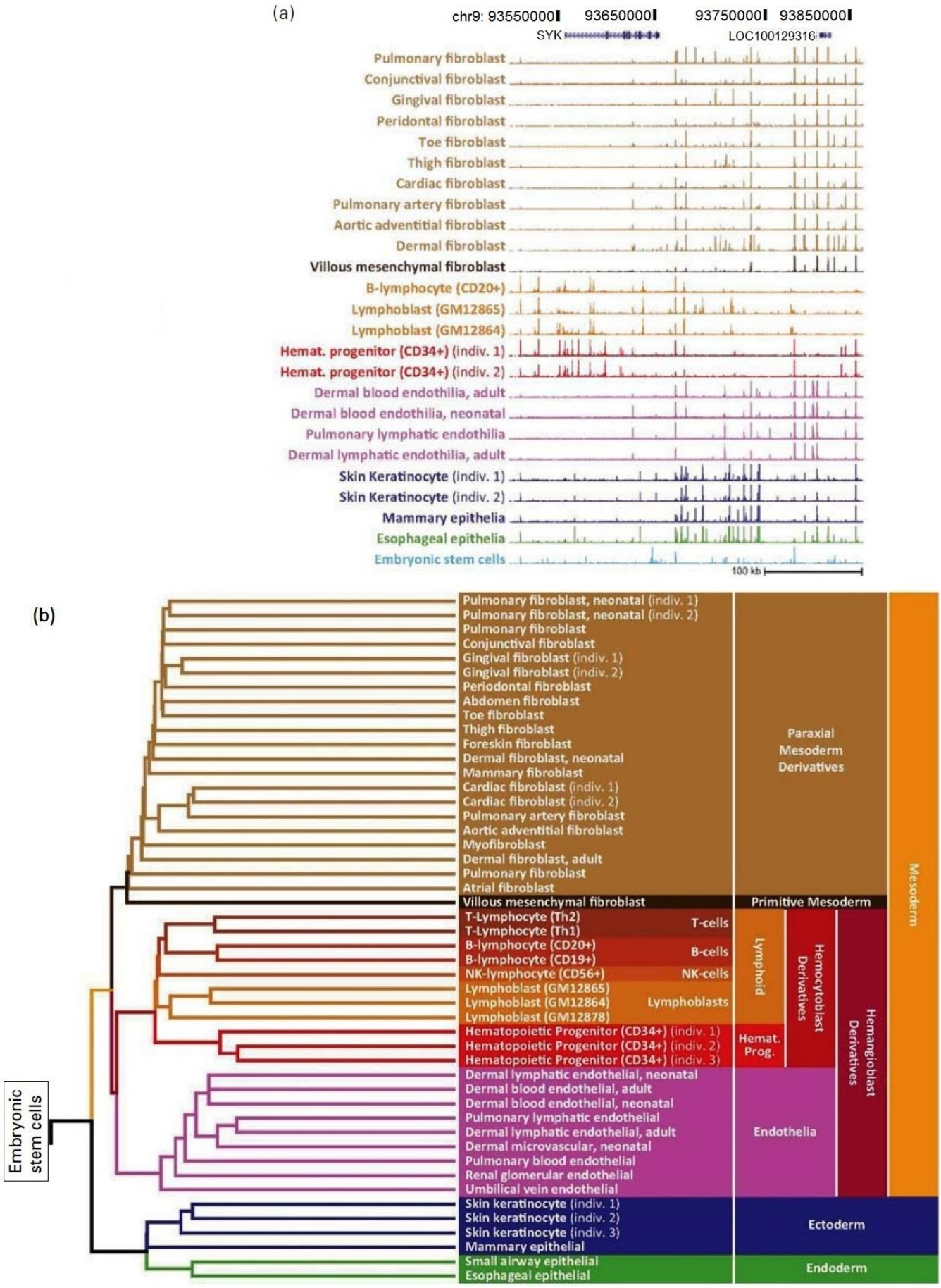
Nüvə Reseptorları Hüceyrəxarici Siqnallar Vasitəsilə Tənzimlənir

Hüceyrələr transkripsiya faktorlarının ekspressiyasını tənzimləməkdən başqa xüsusi bir hüceyrə tipində ekspressiya olunan çox transkripsiya faktorlarının fəallığını da tənzimləyirlər. Məsələn, çox transkripsiya faktorları hüceyrədaxili siqnallar vasitəsilə tənzimlənir. Hüceyrə səthində transmembran reseptor zülallarının hüceyrəxarici domenlərinin və bu reseptorlar üçün spesifik olan, başqa hüceyrələr tərəfindən ifraz olunan və ya qonşu hüceyrə səthində ekspressiya olunan zülal liqandlar arasındakı qarşılıqlı təsir bu transmembran zülalların hüceyrədaxili domenlərini fəallaşdırır, hüceyrə xaricindən alınmış siqnalı hüceyrədaxili siqnala çevirir. Sonra hüceyrədaxili siqnal fosforlaşma, asetilləşmə və digər tipli post-translyasiya zülal modifikasiyaları yolu ilə transkripsiya faktorlarını modifikasiya edən fermentlərin fəallığını tənzimləyir. Bu post-translyasiya modifikasiyaları nüvədə transkripsiya faktorlarını fəallaşdırır və ya ingibirləşdirir. Fəsil 16-da biz zülal liqandlar üçün hüceyrə-səth reseptorlarının əsas tiplərini və transkripsiya faktorlarını tənzimləyən hüceyrədaxili siqnalların əsas yollarını təsvir edirik.

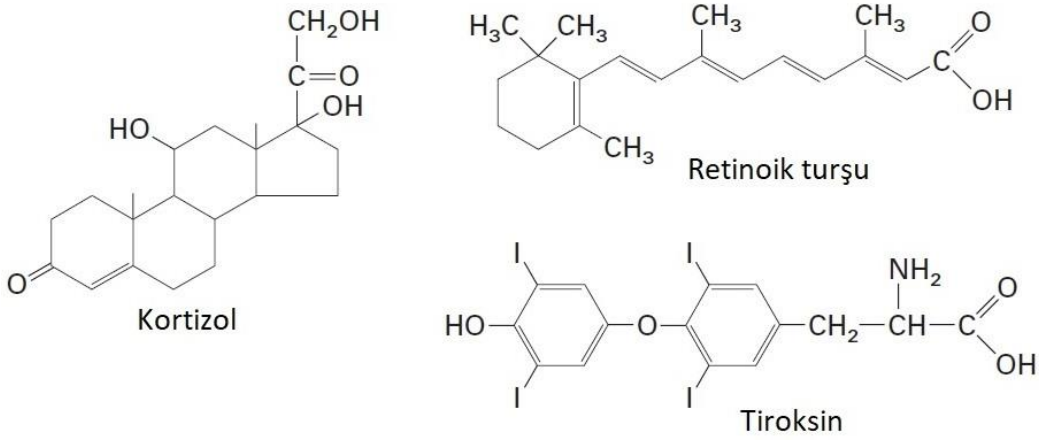
Burada biz, hüceyrəxarici siqnalların transkripsiya faktorlarının fəallığını tənzimləyən başqa bir əsas qrupunu: kiçik, lipiddə-həll olan hormonları, o cümlədən plazma və nüvə membranlarından diffuziya edərək keçə bilən və nəzarət etdikləri transkripsiya faktorları ilə qarşılıqlı əlaqə yarada bilən çoxsaylı müxtəlif steroid hormonlarını, retinoidləri və siroid hormonlarını müzakirə edirik (Şəkil 9-42). Əvvəldə qeyd olunduğu kimi, belə lipiddə-həll olan hormonlarla tənzimlənən transkripsiya faktorlarına *nüvə-reseptor superailəsi* daxildir. Bu transkripsiya faktorları öz liqandları ilə birləşəndə transkripsiyanın aktivatorları kimi fəaliyyət göstərirlər.

Bütün Nüvə Reseptorları Ümumi Domen Quruluşuna Malikdirlər

Müxtəlif nüvə reseptorlarını kodlaşdıran RNT-dən alınan kDNT-lərin ardıcıllığının oxunması onların aminturşu ardıcıllığında nəzərə çarpacaq dərəcədə (qorunub saxlanılmış) konservativliyi aşkar etdi. Həmçinin, aşkar edildi ki, bu reseptorların hər biri üç funksional rayona malikdir (Şəkil 9-43). Birinci rayon, müxtəlif uzunluqda (100-500 amin turçusu) olan unikal N-sonluq rayonudur. Belə dəyişkən rayonun bir hissəsi nüvə reseptorlarının əksəriyyətində fəallaşdırıcı domen kimi fəaliyyət göstərir. İkinci rayon, əsas ardıcıllığın mərkəzində aşkar olunan və C_4 sink-barmaq motif təkrarlarına malik olan DNT-birləşdirən domendir (Şəkil 9-30b). Üçüncü rayon, C-sonluğa yaxın yerləşən hormon-birləşən domen, hormondan-asılı olan fəalllaşma domeninə malikdir (bax Şəkil 9-31b, c). Bəzi nüvə reseptorlarında hormon-birləşdirən domen liqand olmayan haldı repressiya domeni kimi fəaliyyət göstərir.


(a)
chr9: 93550000
93650000
93750000
93850000
SYK
LOC100129316
Pulmonary fibroblast
Conjunctival fibroblast
Gingival fibroblast
Peridontal fibroblast
Toe fibroblast
Thigh fibroblast
Cardiac fibroblast
Pulmonary artery fibroblast
Aortic adventitial fibroblast
Dermal fibroblast
Villous mesenchymal fibroblast
B-lymphocyte (CD20+)
Lymphoblast (GM12865)
Lymphoblast (GM12864)
Hemat. progenitor (CD34+) (indiv. 1)
Hemat. progenitor (CD34+) (indiv. 2)
Dermal blood endothilia, adult
Dermal blood endothilia, neonatal
Pulmonary lymphatic endothilia
Dermal lymphatic endothilia, adult
Skin Keratinocyte (indiv. 1)
Skin Keratinocyte (indiv. 2)
Mammary epithelia
Esophageal epithelia
Embryonic stem cells
100 kb
(b)
Pulmonary fibroblast, neonatal (indiv. 1)
Pulmonary fibroblast, neonatal (indiv. 2)
Pulmonary fibroblast
Conjunctival fibroblast
Gingival fibroblast (indiv. 1)
Gingival fibroblast (indiv. 2)
Periodontal fibroblast
Abdomen fibroblast
Toe fibroblast
Thigh fibroblast
Foreskin fibroblast
Dermal fibroblast, neonatal
Mammary fibroblast
Cardiac fibroblast (indiv. 1)
Cardiac fibroblast (indiv. 2)
Pulmonary artery fibroblast
Aortic adventitial fibroblast
Myofibroblast
Dermal fibroblast, adult
Pulmonary fibroblast
Atrial fibroblast
Villous mesenchymal fibroblast
T-Lymphocyte (Th2)
T-Lymphocyte (Th1)
T-cells
B-lymphocyte (CD20+)
B-lymphocyte (CD19+)
B-cells
NK-lymphocyte (CD56+)
NK-cells
Lymphoblast (GM12865)
Lymphoblast (GM12864)
Lymphoblast (GM12878)
Lymphoblasts
Hematopoietic Progenitor (CD34+) (indiv. 1)
Hematopoietic Progenitor (CD34+) (indiv. 2)
Hematopoietic Progenitor (CD34+) (indiv. 3)
Dermal lymphatic endothelial, neonatal
Dermal blood endothelial, adult
Dermal blood endothelial, neonatal
Pulmonary lymphatic endothelial
Dermal lymphatic endothelial, adult
Dermal microvascular, neonatal
Pulmonary blood endothelial
Renal glomerular endothelial
Umbilical vein endothelial
Skin keratinocyte (indiv. 1)
Skin keratinocyte (indiv. 2)
Skin keratinocyte (indiv. 3)
Mammary epithelial
Small airway epithelial
Esophageal epithelial
Embryonic stem cells
Paraxial Mesoderm Derivatives
Primitive Mesoderm
Lymphoid
Hemocytoblast Derivatives
Hemangioblast Derivatives
Hemat. Prog.
Endothelia
Mesoderm
Ectoderm
Endoderm

ŞƏKİL 9-41 Embrional və yetkin hüceyrələrdə DN-aza I hiperhəssas saytların xəritələri onların inkişaf tarixini əks etdirir. (a) Sol tərəfdə göstərilən, insanın hər bir hüceyrə tipinin DHS-ləri 12-ci xromosomun sol ucundan 96.2 və 96.8 Mə arasındakı intervalda xəritələşdirilmişdir. Şəkildəki hər bir şaquli barın hündürlüyü, məlum olan ardıcıllıqda DN-aza I-in aşağı səviyyəsi ilə linker xromatinin doğranması nəticəsində əmələ gələn DNT uclarına liqasiya etmək üçün tekstdə göstərilən protokola uyğun olaraq bu mövqedə 50-əc ardıcıllıq intervalında oxunmuş ardıcıllıqların dəfələrlə sayını göstərir. Qrafiklər (b)-də göstərildiyi kimi, toxumaların inkişaf etdiyi embrional hüceyrələrə uyğun olaraq rənglə kodlaşdırılmışdır. (b) Tam genomda hər bir hüceyrə tipi üçün DHS xəritələr arasındakı münasibətləri göstərir. Bu hüceyrə tiplərinin hər birinin inkişaf etdiyi embrional toxuma sağ tərəfdə göstərilmişdir. Embrion sütun hüceyrə dendroqramın kökünü əmələ gətirir. Bütün başqa tip hüceyrələr üçün DHS xəritələr embrional sütun hüceyrələrin xəritələrindən bəzi DNS-lərin itirilməsi və bəzilərinin qazanılması ilə törəmişdir. Dendroqram, iki hüceyrə tipinin DHS xəritələrinin nə dərəcədə yaxın olmasına əsaslanaraq hüceyrə tipləri arasında inkişaf əlaqələrini parallelləşdirir. Elsevier, razılığı ilə Stergachis, A.B., et al., "Developmental Fate and Cellular Maturity Encoded in Human Regulatory DNA Landscapes," *Cell*, 2013, **154**: 888-903-dən yenidən çap olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc vasitəsilə alınmışdır.]



ŞƏKİL 9-42 Nüvə reseptorlarına birləşən hormonların nümunələri. Bunlar və bunlara bənzər başqa lipiddə-həll olan hormonlar plazma və nüvə membranlarından diffuziya edərək sitozolda və ya nüvədə olan reseptorlara birləşirlər. Liqand-reseptor kompleksi transkripsiyanın aktivatoru kimi fəaliyyət göstərir.

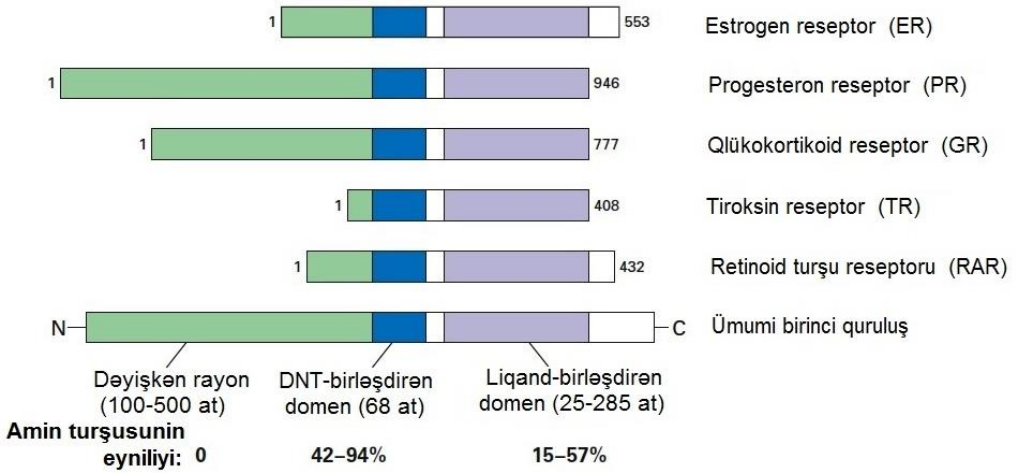
Nüvə-Reseptoru Cavab Elementləri Çevrilmiş və ya Düzünə Təkrarlara Malikdirlər

Nüvə reseptorlarının birləşdiyi DNT saytları *cavab elementləri* adlanır. Bir sıra cavab elementlərinin xarakterik nukleotid ardıcıllıqları müəyyən edilmişdir. İki stereoid hormon reseptorunun cavab elementlərinin – qlikokortikoid reseptor cavab elementi (GRE) və esterogen reseptoru cavab elementi (ERE) konsensus ardıcıllığı bir-biri ilə istənilən üç əsas cütü ilə ayrılmış 6 əc-dən ibarət olan çevrilmiş (tərsinə) ardıcıllıqdır (Şəkil 9-44a, b). Bu kəşf göstərir ki, qohum steroid hormon reseptorları, sonralar homodimer qlikokortikoid reseptorun C_4 sink-barmaq DNT-birləşdirən domeninin rentgen kristalloqrafiya analizlərində göründüyü kimi (bax Şəkil 9-30b), yəqin ki, DNT-yə simmetrik dimerlər (iki dəfə fırlanan simmetriyalı dimer) şəkilində birləşmişdirlər.

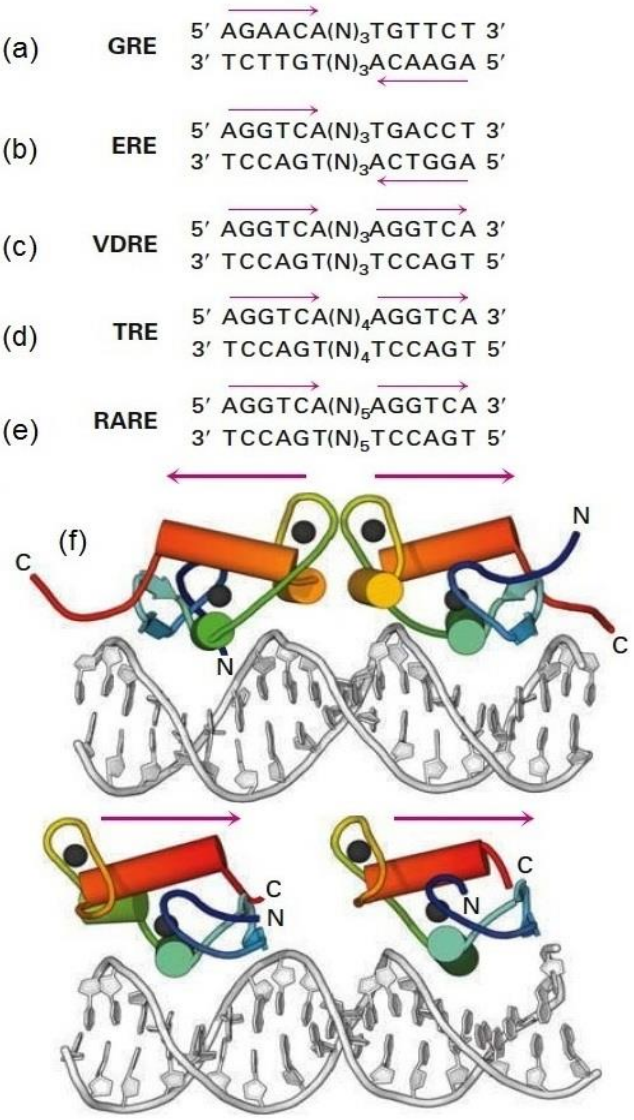
D_3 vitamini, siroid hormonu və retinoid turşusu kimi qeyri steroidləri birləşdirən reseptorlar üçün bəzi nüvə-reseptoru cavab elementləri, estrogen reseptorla tanınan, bir-birindən üçdən beşə qədər əsas cütü ilə ayrılan eyni ardıcıllığın birbaşa təkrarlarıdır (Şəkil 9-44c-e). Bu cavab elementlərinin spesifikliyi təkrarlar arasındakı məsafə ilə müəyyən olunur. Bu cürə birbaşa-təkrar cavab elementlərinə birləşən nüvə reseptorları, hamısı RXR adlanan monomeri bölüşərək heterodimer əmələ gətirirlər. Məsələn, D_3 vitamini cavab-elementi (VDRE) RXR-VDR heterodimerlə birləşir, retinoik turşu cavab elementi (RARE) isə RXR-RAR ilə birləşir. Bu heterodimerləri əmələ gətirən monomerlər bir-biri ilə elə qarşılıqlı təsirdə olurlar ki, iki DNT birləşdirən domen tərsinə (çevrilmiş) istiqamətdə deyil eyni istiqamətdə yerləşərək RXR heterodimerlərə hər bir monomerin birləşmə saytının düzünə təkrarlarına birləşməsinə imkan yaradırlar (Şəkil 9-44f). Əksinə, heterodimer nüvə reseptorlarının (məsələn, GRE və ERE) monomerləri tərsinə (çevrilmiş) istiqamətdə yerləşirlər.

Hormonun Nüvə Reseptoruna Birləşməsi Onun Fəallığını Transkripsiya Faktoru kimi Tənzimləyir

Hormonun nüvə reseptorlarının fəallığına birləşməklə nəzarət etməsi mexanizmi heterodimer və homodimer reseptorlar üçün fərqlidir. Heterodimer nüvə reseptorları (məsələn, RXR-VDR, RXR-TR və RXR-RAR) xüsusi olaraq nüvədə yerləşirlər. Onların hormon liqandı olmadıqda onlar DNT-də onlara doğma olan sayta birləşəndə transkripsiyanı repressiya edirlər. Onlar bunu, əvəllər təsvir olunan mexanizmlə, histon deasetilazaya birləşərək yaxınlıqdakı histon deasetilləşməsinin yönəldilməsi yolu ilə həyata keçirirlər (bax Şəkil 9-37a). Heterodimer nüvə reseptorları öz liqandlarına birləşəndə onlar konformasiya dəyişikliyinə uğrayırlar və bunun nəticəsində onlar histon asetilaza kompleksinə birləşirlər, bununla da özlərinin repressiya olunma təsirlərini geriyə qaytarırlar. Liqand mövcud olanda, reseptorun liqand-birləşmiş konformasiyası Mediatora da birləşir və preinisiasiya kompleksinin toplanmasını stimullaşdırırlar.



ŞƏKIL 9-43 Nüvə-reseptoru superailəsində transkripsiya faktorlarının əsas dizaynı. Mərkəzdə yerləşmiş DNT-birləşdirən domen müxtəlif reseptorlar arasında əhəmiyyətli dərəcədə ardıcıllıq homologiyasını nümayiş etdirir və C4 sink-barmaq motifin iki nüsxəsinə malikdir (bax Şəkil 9-30b). C-sonluq hormon-birləşdirən domen az homologiya nümayiş etdirir. Müxtəlif reseptorların N-sonluq rayonları uzunluqlarına görə fərqlənirlər, unikal ardıcıllıqları var və bir və ya daha ardıq fəallaşdırıcı domenə malik ola bilirlər. Bax R.M. Evans 1988, Science 240: 889.



ŞƏKIL 9-44 Beş nüvə reseptoruna birləşən DNT cavab elementlərinin konsensus ardıcıllığı. (a, b) Qlikokortikoid və estrogen reseptorlar ikiqat simmetrik dimerlər olub, müvafiq olaraq qlikokortikoid reseptorların cavab elementi (GRE) və esterogen reseptorların cavab elementi (ERE) ilə birləşirlər. Bu cavab elementlərinin hər biri üç əsas cütü ilə ayrılmış çevrilmiş təkrarlara malikdirlər. (c, e) Heterodimer nüvə reseptorlarının hər biri başqa nüvə reseptor subvahidləri ilə assosasiyada olan və hormon cavabını müəyyən edən RXR subvahidinə malikdir. RXR-VDR üç əsas cütü ilə ayrılmış düzünə təkrarlardakı (VDRE) eyni DNT əsaslarına birləşməklə D_3 vitaminə cavabı həyata keçirir. RXR-TR dörd əsas cütü ilə ayrılmış düzünə təkrarlardakı (TRE) eyni DNT əsaslarına birləşməklə tiroid hormona cavabı həyata keçirir. Buna oxşar olaraq, RXR-RAR beş əsas cütü ilə bir-birindən ayrılmış eyni birbaşa təkrarlara birləşməklə retinoid turşusuna olan cavabı həyata keçirir, RARE-ni təşkil edir. Bu reseptorların oxuma spiralları ilə birləşmiş təkrar ardıcıllıqlar qırmızı oxlarla göstərilmişdir. (f) Qlikokortikoid reseptorların kristal quruluşu GRA malik olan DNT ilə birləşmiş (*yuxarıda*) və TRE malik olan DNT ilə birləşmiş RXR-TR heterodimer (*aşağıda*). Qırmızı oxlar onların altındakı spirallarda N-dən C-yə orientasiyanı göstərir. Qeyd edək ki, iki tərəfli simmetrik qlikokortikoid reseptorda, oxunan spiral bir-birinə nisbətdə elə tərs çevrilmişdir ki, onlar sol yarımhissədə yuxarı zəncirdə və üç əsas cütü ilə ayrılmış aşağı zəncirdə sağ yarım hissədə AGAACA "oxuyur". Nəticədə, qlikokortikoid reseptorun və esterogen reseptoru kimi başqa ikitərəfli simmetrik homodimerlərin birləşmə saytı çevrilmiş təkrarlardır (bax a və b). Əksinə RXR-TR heterodimerində oxunan spirallar eyni orientasiyadadırlar. Nəticədə onlar, birbaşa-təkrarları birləşdirən sayt olan dörd əsas cütü ilə ayrılmış iki-yarım saytlarda AGGTCA ardıcıllığını eyni orientasiyada oxuyurlar. RXR subvahidi ilə vitamin D_3 reseptorun (VDR) VDRE ilə birləşmiş subvahidi arasındakı araüzü (interfeys) iki oxunan spiralı bir-birinə elə yaxın gətirir ki, onlar dörd əsas cütü ilə deyil, üç əsas cütü ilə ayrılmış eyni yarımsayta birləşirlər. Eynilə, RARE mövqeyində birləşmiş RXR və RAR subvahgidlər arasındakı araüzü iki oxuma spiralını heterodimerdə RXR-TR-ə nisbətən daha uzaq yerləşdirir, beləliklə onlar beş əsas cütü ilə ayrılmış eyni AGGTCA ardıcıllıqlara birləşirlər. Bax K. Umesono et al., 1991, *Cell* **65**:1255, və A.M. Naar et al., 1991, *Cell* **65**:1267. [(f) hissəsi *yuxarıdakı* B. F. Luisi et al., 1991, *Nature* **352**:497–505, PDB ID 1glu. (f) hissəsi *aşağıdakı* F. Rastinejad et al., 1995, *Nature* **375**:203, PDB ID 2nll-dən.]

Heterodimer nüvə reseptorlarından fərqli olaraq homodimer reseptorlar sitoplazmada liqand olmayan halda tapılmışlar. Hormonların bu reseptorlara birləşməsi onların nüvəyə translokasiyasına səbəb olur. Homodimer qlükokortikoid reseptorun (GR) hormondan-asılı olan translokasiyası Şəkil 9-45a-c-də göstərilən transfeksiya eksperimentlərində şərh olunur. GR hormon-birləşən domen bu transportu tək həyata keçirir. Sonrakı tədqiqatlar göstərdi ki, hormon olmadıqda GR nüvəyə daşına bilmir, çünki onun liqand-birləşən domeninin bükülməsi hüceyrənin əsas çaperonu Hsp70 ilə qismən açılır. Nə qədər ki, reseptor sitoplazmada məhdudlaşır o hədəf genlə əlaqə yarada bilmir və beləliklə də transkripsiyanı fəallaşdıra bilmir. Hormonun birləşməsi GR-ın Hsp70-dən Hsp90-a ötürülməsini təşviq edir, bu zaman reaksiyaya qoşulan ATP hidrolizi GR-ın liqand birləşdirən domeninin yenidən bükülməsinə səbəb olur, hormona olan affinliyini qaldırır və GR-ı Hsp70-dən buraxır, beləliklə, o nüvəyə daxil ola bilir. Nüvədə liqandın birləşməsi ilə induksiya olunmuş konformasiyada o hədəf genlə assosasiyada olan cavab elementlərinə birləşə bilir (Şəkil 9-45d). Reseptor ona birləşmiş hormonla cavab elementinə birləşdikdən sonra xromatin-remodelinqlə və histon asetilaza kompleksi və Mediatoru ilə qarşılıqlı əlaqəyə girərək transkripsiyanı fəallaşdırır.

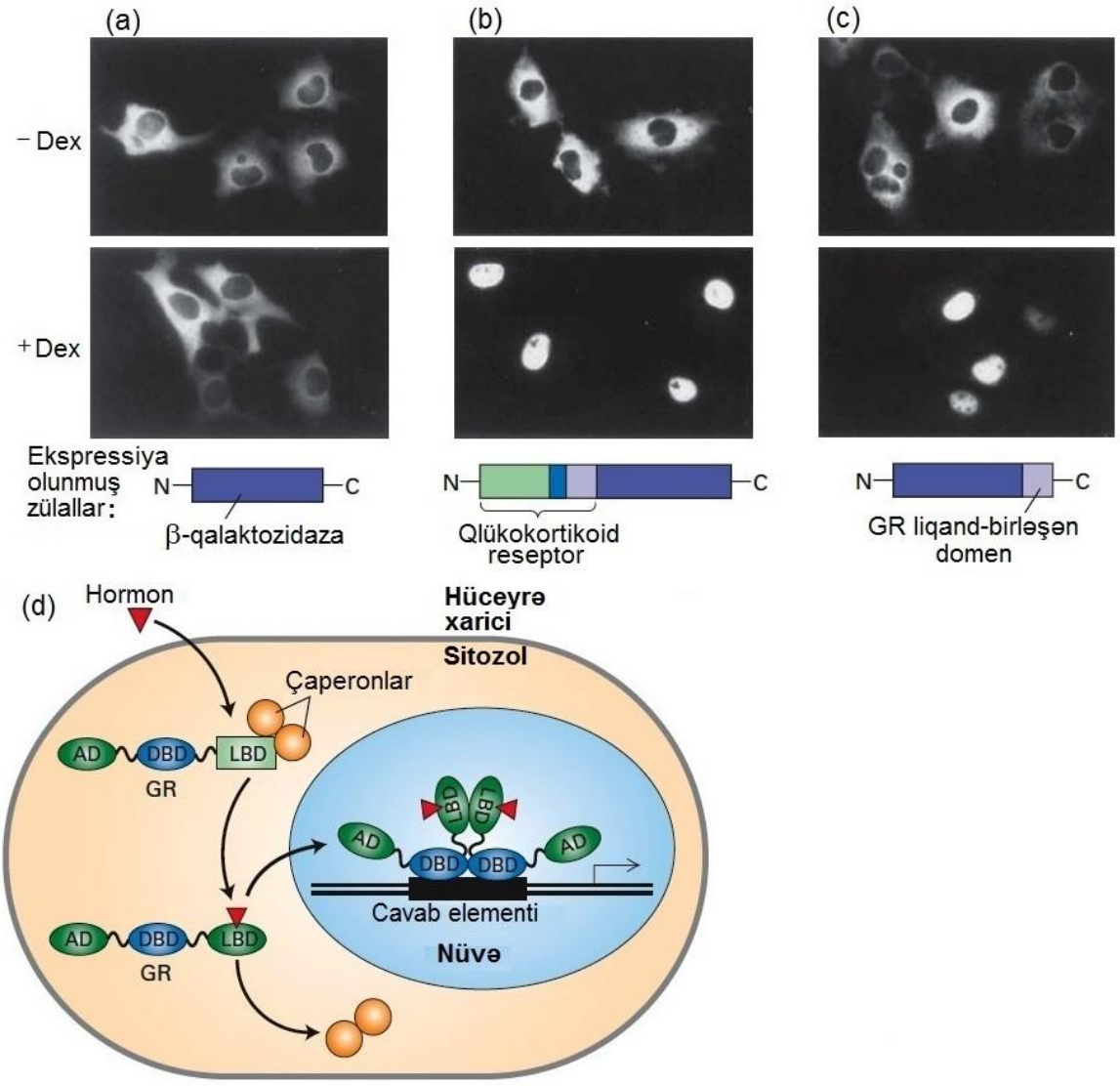
Metazoanlar Polimeraza II-nin İnisiasiyadan Elonqasiya Keçidini Tənzimləyir

Son zamanların gözlənilməyən kəşfi xromatin immun-çokdürmə metodunun istifadəsi ilə, (bax Şəkil 9-18) çoxhüceyrəlilərdə (metazoanlarda) genlərin böyük fraksiyasının transkripsiyanın start nöqtəsindən təxminın 100 əsas cütü məsafə daxilində Polimeraza II-nin elonqasiya etməsinə aram verməsi olmuşdur (Şəkil 9-18). Beləliklə, kodlaşdırılan zülalın ekspressiyasına tək transkripsiyanın inisiasiyası ilə deyil, həmçinin transkripsiya vahidinin erkən dövründə transkripsiyanın elonqasiyası ilə də nəzarət olunur. Transkripsiyanın elonqasiyasının nəzarət olunması ilə tənzimlənən ilk aşkar olunan genlər, denaturasiya olunmuş zülalların yenidən bükülməsinə kömək edən zülal çaperonları və hüceyrələrin denaturasiya olunmuş zülallarla məşğul olmasına kömək edən başqa zülalları kodlaşdıran *istilik-şoku genləri* (məsələn, *hsp70*) olmuşdur. İstilik şoku baş verərkən istilik-şoku transkripsiya faktoru (HSTF) fəallaşır. Fəallaşmış HSTF-in istilik şoku genlərinin promotora-yaxın (promoter-proximal) rayonunda spesifik saytlara birləşməsi aram vermiş polimerazanın zəncirin elonqasiyasını davam etdirməsini simullaşdırır və əlavə RNT Pol II molekullarının tez şəkildə yenidən inisiasiyasını həyata keçirərək dəqiqə ərzində çoxsaylı inisiasiyanın baş verməsinə səbəb olur. Transkripsiyaya nəzarətin bu mexanizmi tez cavaba imkan verir: dayandırılmış transkripsiya vəziyyətində bu genlərə həmişə aram verilir və ona görə də təcili tələbat yaranarkən, promotor üzərində xromatinin remodelinqi və asetilləşməsi və transkripsiyanın preinisiasiyası kompleksinin yığılması üçün zamana ehtiyac qalmır.

Göstərilmişdir ki, transkripsiyanın start saytı yaxınlığında aram verən Pol II-nin elonqasiyasına nəzarət etməklə transkripsiyanı tənzimləyən digər transkripsiya faktoru MYC-dir, bu da hüceyrə bölünməsi və inkişafının tənzimlənməsində fəaliyyət göstərir. Çox hallarda MYC xərçəng hüceyrələrində yüksək səviyyədə ekspressiya olunur və somatik hüceyrələri istənilən digər hüceyrə tipinə differensasiya etmək qabliyyətinə malik olan pluripotent sütun hüceyrələrin yenidən-proqramlaşdırılmasının əsas transkripsiya faktorudur. Differensasiya etmiş hüceyrələrin pluripotent sütun hüceyrələrə çevrilməsini induksiya etmək qabliyyəti, onun degenerativ xəstəliklərdə və sinir sisteminin travmatik yaralanmalarına qarşı terapevtik müalicənin inkişafındakı potensialına görə həddən artıq böyük tədqiqat maraqları yaratmışdır (bax Fəsil 21).

Transkripsiyanın Terminasiyası da Tənzimlənir

Pol II transkripsiyanın start saytından təxminən 200 nukleotidi transkripsiya etdikdən sonra genlərin əksəriyyətində elonqasiya boyu yüksək məhsuldar olur. Amma, Pol II-nin spesifik anticismi ilə xromatin immunçökdürmə göstərir ki, hüceyrələrin populyasiyasında transkripsiya vahidinin müxtəlif vəziyyətlərində Pol II-nin miqdarı güclü şəkildə fərqlənir (Şəkil 9-18b, *sağda*). Bu göstərir ki, ferment bəzi rayonlarda digərlərinə nisbətən daha sürətlə elonqasiya edə bilir. Çox hallarda, kodlaşdırılan mRNT-nin 3′ sonluğunu əmələ gətirən ardıcıllıqda RNT-nin kəsilməsini və poliadenilləşməsini istiqamətləndirən bütün ardıcıllıq transkripsiya olunub qurtarana qədər Pol II transkripsiyanı terminasiya etmir. Sonra RNT polimeraza II, bu Poli (A) əlavə olunan saytdan 0.5-2.0 kə məsafədə yerləşən çoxsaylı müxtəlif saytlardan istənilən birində terminasiya edə bilir. Mutant genlərlə aparılan eksperimentlər göstərir ki, terminasiya transkriptin 3′ sonluğunu kəsən və poliadenilləşdirən proseslə birləşir, bu növbəti fəsildə müzakirə olunur.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 9-45 Qovşaq zülallar göstərir ki, qlükokortikoid reseptorun hormon-birləşdirən domeni hormon mövcud olanda nüvəyə translokasiyanı həyata keçirir. Kultura olunmuş heyvan hüceyrələri aşağıdakı diaqramda göstərilən zülalları kodlaşdıran ekspressiya vektorları ilə transfeksiya olunmuşlar. Transfeksiya olunmuş hüceyrələrdə ekspressiya olunan zülalları aşkar etmək üçün β-qalaktozidazaya spesifik nişanlanmış anticismlərlə immunofluoressensiya istifadə olunmuşdur. (a) β-qalaktozidazanı tək ekspressiya edən hüceyrələrdə qlükokortikoid hormon deksametazon (Dex) iştirak edən və etməyən hallarda ferment sitoplazmada yerləşir. (b) β-qalaktozidaza və tam qlükokortikoid reseptordan (GR) təşkil olunmuş qovşaq zülalları ekspressiya edən hüceyrələrdə qovşaq zülallar hormon olmayan halda sitoplazmada aşkar olunmuşdur, amma hormon olan halda nüvəyə daşınmışdır. (c) β-qalaktozidazadan və yalnız GR-liqand-birləşdirən domendən (açıq bənövşəyi) təşkil olunmuş qovşaq zülalları ekspressiya edən hüceyrələr də həmçinin qovşaq zülalların nüvəyə hormondan-asılı olan daşınmasını nümayiş etdirdilər. (d) Homodimer nüvə reseptorları ilə hormondan-asılı olan gen fəallaşdırılması modeli. Hormon olmayan zaman reseptor, onun liqand-birləşdirən domeni (LBD) ilə və çaperon zülallar arasındakı qarşılıqlı təsir nəticəsində sitoplazmada saxlanılır. Hormon mövcud olanda, o plazma membrandan diffuziya edərək keçib liqand-birləşdirən domenə birləşir və reseptoru çaperon zülallardan ayıran konformasiya dəyişikliyinə səbəb olur. Liqandla birləşmiş reseptor sonra nüvəyə translokasiya edir, burada onun DNT-birləşdirən domeni (DBD) cavab elementinə birləşir və hədəf genin transkripsiyasını stimullaşdırmaq üçün liqand-birləşdirən domenə və N-sonluqdakı əlavə fəallaşdırıcı domenə (AD) imkan yaradır. [(a)-(c) hissələri D. Picard vəK.R. Yamamoto, Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor," EMBO 1987, EMBO J. 6:3333; müəlliflərdən nəzakətlə.]

9.6 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Transkripsiya-Faktorları Fəallığının Tənzimlənməsi

- Çox transkripsiya faktorlarının fəallığı hüceyrəxarici zülalların və peptidlərin hüceyrə-səthi reseptorlarına birləşməsi ilə dolayı yolla tənzimlənir. Bu reseptorlar, spesifik transkripsiya faktorlarını, Fəsil 16-da müzakirə olunan müxtəlif mexanizmlərlə tənzimləyən hüceyrədaxili siqnal-ötürülməsi yollarını fəallaşdırır.
- Nüvə reseptorları, lipiddə-həllolan və DNT-də xüsusi cavab elementləri ilə qarşılıqlı əlaqə yaradan dimer C4 sink-

barmaq transkripsiya faktorları superailəsini təşkil edirlər (bax Şəkillər 9-42 – 9-44).

- Hormonun nüvə reseptorlarına birləşməsi onların başqa zülallarla qarşılıqlı əlaqəsini modifikasiya edən konformasiya dəyişikliklərini induksiya edir (bax Şəkil 9-31b-c).
- Heterodimer nüvə reseptorları (məsələn, retinoidlər, vitamin D və siroid hormonları üçün olanlar) yalnız nüvədə tapılmışlar. Hormon olmadıqda onlar uyğun cavab elementləri vasitəsi ilə hədəf genin transkripsiyasını repressiya edirlər. Onlar öz liqandlarına birləşəndə transkripsiyanı fəallaşdırırlar.
- Steroid hormon reseptorları homodimer nüvə reseptorlarıdır. Hormon olmadıqda onlar çaperon zülallarla tutularaq sitoplazmada qalırlar. Liqanda birləşəndə onlar nüvəyə translokasiya edirlər və hədəf genin transkripsiyasını fəallaşdırırlar (bax Şəkil 9-45).
- DN-aza I hiperhəssas saytlar (DHS) xromatində transkripsiya-faktoru birləşdirən saytları göstərirlər, amma, hansı transkripsiya faktorlarının birləşdiyini göstərmirlər. Bununla belə, differensasiya edən hüceyrələrdə DHS-lərin xəritələşdirilməsi hüceyrənin müəyyən bir hüceyrə tipinə differensasiya etməsi ilə transkripsiya-faktoru-birləşdirən saytların necə dəyişdiyinə dair məlumat verir.
- Metazoanlarda RNT olimeraza II çox hallarda transkripsiya start saytından təxminən 50-100 əsas cütü məsafə daxilində aram verir. Bu aram vermədən azad olmaq genin transkripsiyasının tənzimlənməsinə kömək edir.
- Promoter-proksimal rayonda aram verən Pol II vasitəsilə elonqasiyanın bərpa olunması da gen transkripsiyası üçün tələb olunur və tənzimlənən mərhələdir.
- Əksər hallarda, RNT-nin kəsilməsini və poliadenilləşməsini istiqamətləndirən ardıcıllıq transkripsiya olunub qurtarana qədər Pol II transkripsiyanı dayandırmır.

9.7 Transkripsiyanın Epigenetik Tənzimlənməsi

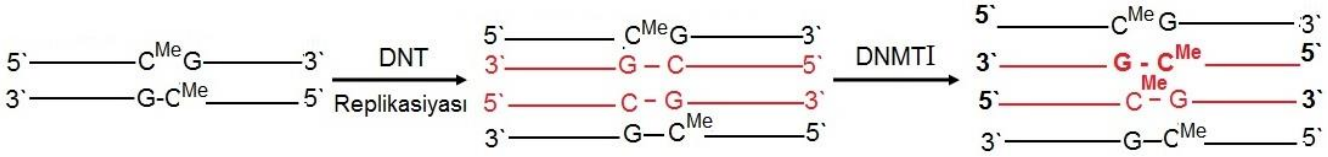
Epigenetika sözü DNT ardıcıllığındakı dəyişikliyin nəticəsi olmayan, hüceyrə fenotipindəki dəyişikliyin irsən ötürülməsinə deyilir. Məsələn, sümük iliyi sütun hüceyrələrinin bir neçə müxtəlif tip qan hüceyrələrinə differensasiya etməsi zamanı hematopoietik sütun hüceyrələr (HSC) iki qız hüceyrəyə bölünür, bunlardan biri bütün müxtəlif tipli qan hüceyrələrinə differensasiya etmək potensialına malik olan HSC xüsusiyyətini saxlamaqda davam edir. Amma, digər qız hüceyrə ya limfoid sütun heceyrəyə ya da myeloid sütun hüceyrəyə çevrilir (bax Şəkil 21-17). Limfoid sütun hüceyrələr, patogenlərə qarşı immun sisteminə daxil olan çoxsaylı müxtəlif funksiyaları həyata keçirən limfositlərə differensasiya edən qız hüceyrələrini yaradır (Fəsil 23). Myeloid sütun hüceyrələr isə bölünüb qız hüceyrələrə ayrılır, onlar da differensasiya edərək qırmızı qan hüceyrələrini, faqosit xüsusiyyətinə malik olan başqa tipli ağ qan hüceyrələrini (leykositləri) və ya qanın laxtalanmasında iştirak edən trombositləri yaradırlar. Rüşeyim (yumurta hüceyrələrinin sperma hüceyrələri ilə mayalanması nəticəsində bütün hüceyrələrin inkişaf etdiyi ziqot) yaranarkən limfoid və myeloid əcdad hüceyrələr hər ikisi eyni (identik) DNT ardıcıllığına malik olurlar, amma onlar aralarındakı epigenetik fərqlərinə görə məhdud inkişaf potensialına malik olurlar.

Bu cürə epigenetik dəyişikliklər ilkin olaraq, transkripsiya faktorlarını və hal-hazırda intensiv tədqiqat obyektinə çevrilən gen nəzarətinin kompleks şəbəkəsində hüceyrə-hüceyrə kommunikasiyasına daxil olan zülalları kodlaşdıran digər genlərin ekspressiyasına nəzarət edən, hüceyrə differensasiyasının əsas tənzimləyiciləri olan master transkripsiya faktorlarının ekspressiyasının nəticəsidir. Gen ekspressiyasında transkripsiya faktorları ilə inisiasiya olunan dəyişiklik çoxsaylı hüceyrə bölünməsi zamanı, histonların post-translyasiya modifikasiyası və DNT-nin sitozin pirimidin həlqəsinin 5 vəziyyətində metilləşməsi (Şəkil 2-17) yolu ilə gücləndirilir və saxlanılır, hüceyrələr bölünərkən yeni qız hüceyrələrə ötürülür. Beləliklə, *epigenetika markası* histonların belə post-translyasiya modifikasiyası və DNT-nin 5-metil C modifikasiyası üçün istifadə olunur.

DNT Metilləşməsi Transkripsiyanı Repressiya Edir

Əvəllər qeyd olunduğu kimi, məməlilərdə promotorun əksəriyyəti CpG ada sinifinə düşür. Fəal CpG ada promotorlar metilləşməmiş C-lər və CG ardıcıllıqlara malikdirlər. Metilləşməmiş CpG ada promotorlar histon oktamerlərə qarşı azalmış affinliyə malikdirlər, amma metilləşməmiş birbaşa CpG ada promotorun qonşuluğunda olan nukleosomlar histon H3 lizin 4-də di- və ya trtimetilləşmə yolu ilə modifikasiya olunur və əvvəllər müzakirə olunduğu kimi həm sens həm də antisens DNT templeytında transkripsiyanın gedişi zamanı aram verən Pol II molekulları ilə assosasiya edir (Şəkil 9-18 və 9-19). Son zamanların tədqiqatları göstərir ki, histon H3 lizin 4-ün metilləşməsi siçan hüceyrələrində baş verir ona görə ki, Cfp1 adlanan zülal (CXXC barmaq zülal 1) metilləşməmiş CpG-zəngin DNT-yə sink-barmaq domeni vasitəsilə ilə (CXXC) birləşir və histon H3 lizin 4 spesifik histon metilaza (Setd1) ilə assosasiyaya edir. Xromatin-remodelinq kompleksləri və Pol II preinisiasiya kompleksini inisiasiya edən əsas transkripsiya faktoru TFIID (Şəkil 9-19), H3 lizin 4 trimetil nişanını yaradaraq nukleosomlarla birləşir və Pol II ilə transkripsiyanın inisiasiyasını həyata keçirir.

Amma, differensasiya etmiş hüceyrələrdə spesifik CpG ada promotorların hüceyrə tipindən asılı olan kiçik bir faizi, 5-metil C ilə nişanlanmış CpG-lərə malikdirlər. 5 metil-C modifikasiya olunmuş CpG-lərlə zəngin olan DNT-yə birləşən zülallar ailəsi (metil CpG-birləşdirən zülallar, MBD-lər) histon deasetilazalarla birləşərək xromatini kondensasiya edən xromatin-remodelinq komplekslərini repressiya edir və nəticədə transkripsiyanın repressiyası baş verir. 5-metil C CpG-lərə DNMT3a və DNMT3b adlanan DNT metil transferazalar vasitəsi ilə əlavə olunur. Onlar de nova DNT metil transferazalar hesab edilir, çünki onlar metilləşməmiş C-ni yenidən metilləşdirirlər. DNMT3a və b-nin spesifik CpG adalara necə yönəlmələrinin öyrənilməsi istiqamətində çox suallar hələ öyrənilməmişdir. Amma, onlar DNT ardıcıllığını metilləşdirdikdən sonra, DNT ardıcıllığında C-dəki metilləşmə, hər yerdə mövcud olan DNMT1 metiltransferazanın fəaliyyəti ilə DNT replikasiyası yolu ilə ötürülür:



(qırmızılar qız zəncirləri göstərir). Nəticə etibarı ilə, CpG ada promotor DNMT3a və ya b ilə metilləşdikdən sonra, o müvafiq qız hüceyrələrdə DNMT1 tərəfindən metilləşməkdə davam edir. Nəticədə, hətta DNMT3a və ya b tərəfindən ilkin C-metilləşmənin stimulu dayandırıldıqdan sonra da belə, promotor bütün növbəti qız hüceyrələrdə MBD-lərlə qarşılıqlı təsir yolu ilə supressiya olunmuş vəziyyətdə olur. Ona görə də, metilləşmiş promotorun repressiyası hüceyrə bölünməsi yolu ilə nəsilə ötürülür. Epigenetik repressiyanın bu mexanizmi sıx şəkildə tədqiq olunur, çünki sonralar 24-cü Fəsildə müzakirə olunduğu kimi, xərçəngin inkişafının supressiya edilməsində fəaliyyət göstərən zülalları kodlaşdıran şiş-supressor genlər tez-tez hallarda xərçəng hüceyrələrində onların promotor rayonlarının qeyri-normal CpG metilləşməsinə görə fəalsızlaşırlar.

Spesifik Histon Lizinlərinin Metilləşməsi Gen Repressiyasının Epigenerik Mexanizmləri ilə Əlaqəlidir

Şəkil 8-26b histonlarda tapılmış post-translyasiya modifikasiyasının, o cümlədən lizinlərin asetilləşməsini və lizin yan zəncirində terminal ε-amin qrupunun azot atomunda lizinlərin metilləşməsi kimi fərqli tiplərini ümumiləşdirərək göstərir (bax Şəkil 2-14). Lizinlər bir, iki və ya üç metil qruplarının terminal azot atomuna əlavə olunaraq mono-, di- və trimetilləşmiş lizini yaratmaqla modifikasiya oluna bilərlər və bunların hamısı tək bir müsbət yükü daşıyırlar.

Xüsusi bir nukleosomda spesifik histon lizinindəki asetilləşmə vəziyyəti histon asetilazalar və histon deasetilazalar vasitəsi ilə baş verən müvafiq asetilləşmə və deasetilləşmə arasındakı dinamik tarazlığın nəticəsidir. Xromatinin lokal bir rayonunda DNT-birləşmiş aktivatorlar keçici olaraq histon asetilaza komplekslərinə birləşəndə histonların asetilləşməsi dominantlıq təşkil edir. Repressorlar keçici olaraq histon deasetilaza kompleksinə birləşdikdə isə deasetilləşmə üstünlük təşkil edir. Puls-izləmə yolu ilə radionişanlama eksperimentləri göstərdi ki, histon lizinlərində asetil qrupları histon asetilaza və histon deasetilazanın ardıcıl fəaliyyəti nəticəsində çox tez dəyişilir. Əksinə, histonlar üzərində metil qrupları daha çox stabildirlər. Histon lizin metil qrupları *histon lizin demetilazalar* vasitəsilə uzaqlaşdırıla bilər. Amma, nəticədə histon lizinin metil qrupunun baş verən dövriyəsi histon lizinin asetil qrupunun dövriyəsinə nisbətən daha zəif baş verir, bu da metilləşməni epigenetik informasiyanın yayılması üçün daha çox müvafiq post-translyasiya modifikasiyasına çevirir.

Histonlarda bir sıra başqa post-translyasiya modifikasiyaları xarakterizə olunmuşdur (Şəkil 8-26b). Bu modifikasiyaların hamısı, transkripsiyanı və eləcə də xromosomların mitoz zamanı meydana gələn yüksək kondensasiya olunmuş quruluşda bükülməsi kimi başqa prosesləri tənzimləmək üçün xromatin lifləri ilə qarşılıqlı əlaqədə olan zülalların birləşməsini müsbət və ya mənfi tənzimləmək potensialına malikdirlər (Şəkil 8-35 və 8-36). Xromatin lifindən nizamsız spirallar şəkilində uzanan histon quyruqlarının, çoxsaylı müxtəlif zülal komplekslərinin birləşməsini tənzimləməklə transkripsiyanı və digər prosesləri tənzimləyən bir sıra modifikasiyaların mümkün olan kombinasiyalarından birini yaratmaq üçün post-translyasiya modifikasiya olunmuş xromatin mənzərəsi meydana gəldi. Histonların müxtəlif post-translyasiya modifikasiyalarının kombinasiya olunmuş təsiri nəticəsində əmələ gələn spesifik xromatin rayonları ilə zülal qarşılıqlı əlaqələrinin bu cürə nəzarət olunması ***histon kodu*** adlandırılır. Bu modifikasiyaların bəziləri, məsələn, histon lizin asetilləşməsi çox tez geriyə dönəndir, halbuki histon lizin metilləşməsi kimi digərləri, xromatinin replikasiyasında templeyt kimi istifadə oluna bilir və DNT ardıcıllığının irsiyyəti ilə yanaşı epigenetik irsiyyəti yaradır. Cədvəl 9-3-də, spesifik histon amin turşusu qalıqlarının post-translyasiya modifikasiyalarının bir qayda olaraq transkripsiya zamanı göstərdikləri təsir ümumiləşdirilmiş şəkildə verilir.

Heteroxromatində Histon H3 Lizin 9 Metilləşməsi

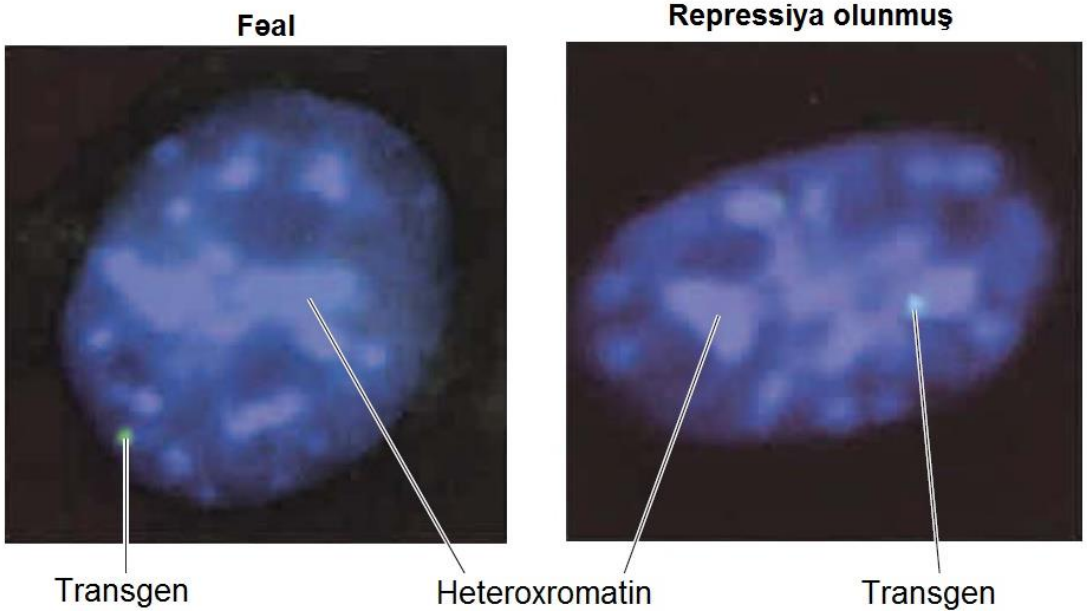
Eukariotların əksəriyyətində bəzi ko-repressor komplekslər, histon H3 lizin 9-u metilləşdirərərk di- və trimetil lizinləri yaradan histon metiltransferaza subvahidlərinə malikdirlər. Bu metilləşmiş lizinlər, Fəsil 8-də müzakirə olunduğu kimi, heteroxromatinin kondensasiyasında fəaliyyət göstərən HP1 zülalın izoformalarının birləşmə saytlarıdır (bax Şəkil 8-29). Məsələn, KAP1 ko-repressor kompleks insan genomunda kodlaşdırılan, 200-dən çox sink-barmaq transkripsiya faktorlarından ibarət olan transkripsiya faktoru sinifi ilə fəaliyyət göstərir. Bu ko-repressor kompleksə, repressiya olunan genin promotor rayonundan yuxarıda nukleosomları metilləşdirən və beləliklə HP1-in birləşməsinə və transkripsiyanın repressiyasına səbəb olan H3 lizin 9 metil transferaza daxildir. Siçanın kultura olunan fibroblastlarında, KAP1-in təsiri ilə repressiya olunan, inteqrasiya olunmuş transgen ko-repressor hüceyrələrin əksəriyyətində heteroxromatinlə assosasiya edir, halbuki eyni transgenin fəal forması euxromatinlə assosasiyada olur (Şəkil 9-46). Xromatin immunçökdürmə sınaqları (bax Şəkil 9-18) göstərdi ki, repressiya olunan gen lizin 9-da metilləşmiş histon H3 ilə və HP1 ilə assosasiyada olduğu halda, fəal gen olmur.

Qeyd etmək vacibdir ki, H3 lizin 9-un metilləşməsi xromosom replikasiyasında Şəkil 9-47 diqaramında verilmiş mexanizm ilə qorunub saxlanılır. DNT-nin metilləşmiş rayonu S fazada replikasiya edərkən valideyn DNT ilə assosasiyada olan histon oktamerlər nizamsız şəkildə qız DNT molekullarına paylanır. Lizin 9-da metilləşməmiş yeni histon oktamerlər də yeni qız xromosomlarla assosasiya edir, amma valideyn histon oktamerlər qız xromosomların hər ikisi ilə assosasiya etdiyindən, qız xromosomların nukleosomlarının təxminən yarısı lizin 9-da metilləşmiş olur. Histon H3 metil transferazanın

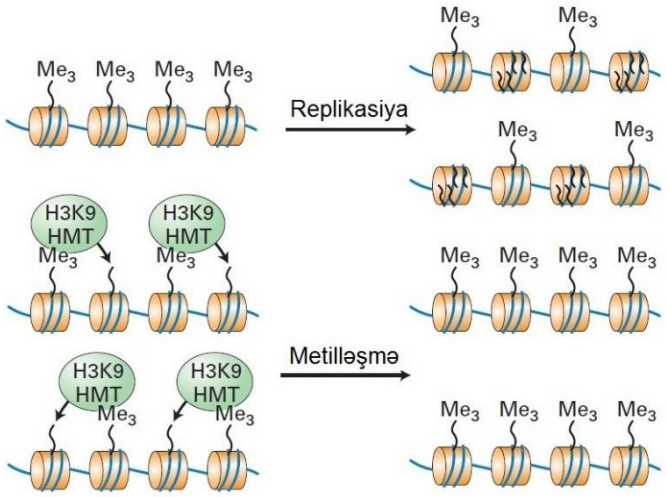
(birbaşa və ya dolayı yolla) valideyin metilləşmiş nukleosomlar ilə assosasiyası yeni toplanmış histon oktamerlərin metilləşməsinə aparır. Bu prosesin hər bir hüceyrə bölünməsi zamanı təkrarlanması xromosomun bu rayonunda H3 lizin 9 metilləşmənin qorunub saxlanılmasına səbəb olur.

Cədvəl 9-3 Histon Post-Translyasiya Modifikasiyaları Fəal və Repressiya Olunan Genlərlə Bağlıdır

Modifikasiya	Modifikasiya saytları	Transkripsiyaya təsir
Asetilləşmiş lizin	H3, (K9, K14, K18, K27, K56)	Fəallaşma
	H4, (K5, K8, K13, K16)	Fəallaşma
	H2A (K5, K9, K13)	Fəallaşma
	H2B (K5, K12, K15, K20)	Fəallaşma
Hiperasetilləşmiş lizin		Repressiya
Fosforlaşmış Serin/treonin	H3 (T3, S10, S28)	Fəallaşma
	H2A (S1, T120)	Fəallaşma
	H2B (S14)	Fəallaşma
Metilləşmiş arginin	H3 (R17, R23)	Fəallaşma
	H4 (R3)	Fəallaşma
Metilləşmiş lizin	H3 (K4) Me3 promoter rayonunda	
	H3 (K4) Me1 enhanserdə	Fəallaşma
	H3 (K36, K79) transkripsiyan olunan rayonda	Elonqasiya
	H3 (K9, K27)	Repressiya
	H4 (K20)	Repressiya
Ubikvitinləşmiş lizin	H2B (K120 məməlilərdə, K123 *S. cerevisiae*-də	Fəallaşma
	H2A (K119 məməlilərdə)	Repressiya



ŞƏKİL 9-46 Repressiya olunmuş transgenin heteroxromatinlə assosasiyası. Siçanın fibroblastları konstruksiya olunmuş repressor üçün birləşmə saytına malik olan transgenlə stabil transformasiya olunmuşdur. Repressor DNT birləşdirən domenlə, KAP1 ko-repressor kompleksla qarşılıqlı təsirdə olan repressiya domeni ilə qovşaq zülalın nüvəyə daşınmasının eksperimental nəzarət olunmasına imkan yaradan nüvə reseptorunun liqand-birləşdirən domeni arasında qovşaq olunmuşdur (bax Şəkil 9-45). DNT DAPI ilə göy rəngə boyanmışdır. Parlaq boyanmış rayonlar heteroxromatin rayonlarıdır, burada DNT-nin qatılığı euxromatindəkinə nisbətən çox yuxarıdır. Transgen fluoressent nişanlanmış komplementar problarla hibridləşmə yolu ilə aşkar olunmuşdur (yaşıl). Rekombinant repressor sitoplazmada saxlanılarkən transgen transkripsiya olunur (*solda*) və hüceyrələrin əksəriyyətində euxromatinlə assosasiyada olur. Hormon əlavə edilərkən rekombinant repressor nüvəyə daxil olur, beləliklə, transgen repressiya olunur (*sağda*) və heteroxromatinlə assosasiyada olur. Xromatin immun-çökdürmə sınaqları (bax Şəkil 9-18) göstərir ki, repressiya olunan gen lizin 9-da metilləşmiş histom H3 və HP1 ilə əlaqədə olduğu halda fəal gen olmur. [Ayyanathan, K. et al., "Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation," *Genes and Development*, 2003,**17**:1855–1869-dən. Nəzakətlə Frank Rauscher tərəfindən; Cold Spring Harbor Laboratory Press razılığı ilə yenidən çap olunur.]



ŞƏKIL 9-47 Xromosom replikasiyası gedişində histon H3 lizin metilləşmənin saxlanılması. Xromosom DNT-si replikasiya olunanda valideyn histonları iki qız DNT molekulları ilə təsadüfi şəkildə birləşirlər, halbuki S faza ərzində sintez olunan metilləşməmiş histonlar qız xromosomlarda başqa nukleosomları təşkil edirlər. Histon H3 metil transferazaların (H3K9 HMT) valideyn nukleosomlarla birləşməsi histon 3 lizin 9-un di- və ya trimetilləşmə nişanını yaradaraq yeni əlavə olunmuş modifikasiya olunmamış nukleosomları metilləşdirirlər. Nəticədə, histon 3 lizin 9 metilləşmə təkrarlanan hüceyrə bölünmələrində saxlanılır, əks halda onlar spesifik olaraq histon demetilaza tərəfindən uzaqlaşdırılır.

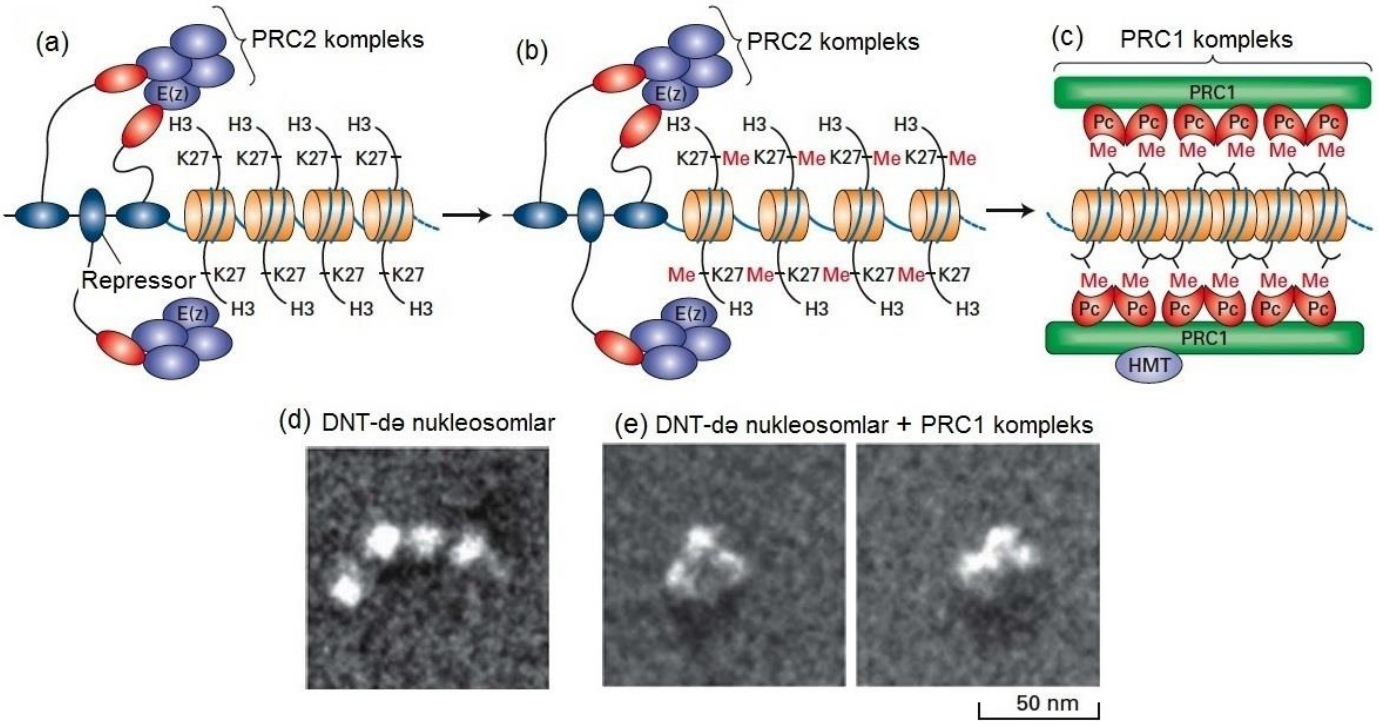
Polikomb və Tritoraks Kompleksləə Epigenetik Nəzarət

Çoxhüceyrəli heyvanlarda və bitkilərdə spesifik hüceyrə tiplərində genlərin repressiyası üçün əhəmiyyətli olan başqa tipli epigenetik nişana, Polikomb zülallar kimi məlum olan zülallar dəsti və onlarla əks təsirdə olan Tritorax zülallar kimi məlum olan zülallar dəsti daxildirlər. Bunlar, ilk dəfə kəşf olunduqları *Drosophila*-da bu zülalları kodlaşdıran genlərin mutasiyasından alınan fenotipinə görə adlandırılmışlar. Polikomb repressiya mexanizmi xüsusi hüceyrə tiplərinin və orqanizmin bütün həyatı dövründə bu tiplərdən inkişaf edən müvafiq hüceyrələrdə genlərin repressiyasının saxlanılması üçün əhəmiyyətlidir. Polikomb zülallarla tənzimlənən əhəmiyyətli genlərə, master tənzimləyici transkripsiya faktorlarını kodlaşdıran *Hox* genlər daxildir. Hox transkripsiya faktorlarının fərqli kombinasiyaları inkişaf etməkdə olan rüşeyimdə spesifik toxumaların və orqanların inkişafını aşkar etməyə kömək edir. Embriogenezin erəkən dövründə *Hox* genlərin ekspressiyasına nəzarət tipik aktivator və repressor zülallarla həyata keçirilir. Amma, bu aktivator və repressorların ekspressiyası embriogenezin erkən dövründə dayanır. Erkən embrion hüceyrələrindən əmələ gələn hüceyrələrdə *Hox* genlərin düzgün ekspressiyası, sonralar embriogenezin qalan dövründə və yetkinlik dövründə spesifik *Hox* genlərin repressiyasını həyata keçirən Polikomb zülallar vasitəsi ilə təşkil olunub saxlanılır. Tritoraks zülallar, ilkin embriogenezdə spesifik hüceyrələrdə və onlardan törənən bütün sonrakı hüceyrələrdə *Hox* genlərin ekspressiyasını təşkil edərək Polikomb zülalların funksiyasına əks olan fəaliyyəti həyata keçirir. Polikomb və Tritoraks zülallar minlərlə genlərə, o cümlədən hüceyrənin inkişafını və bölünməsini tənzimləyən (başqa zözlə, Fəsil 19-da müzakirə olunan hüceyrə tsikli) genlərə nəzarət edir. Polikomb və Tritoraks genlər tez-tez hallarda xərçəng hüceyrələrində mutasiya olunur və bu hüceyrələrin qeyri-normal xassələrinin yaranmasına əhəmiyyətli dərəcədə kömək edirlər (bax Fəsil 24).

Maraqlıdır ki, virtual olaraq inkişaf etməkdə olan rüşeyimdə və yetkin orqanizmdə bütün hüceyrələr oxşar dəstdə Polikomb və Tritoraks zülalları ekspressiya edirlər və bütün hüceyrələr eyni *Hox* genlər dəstinə malikdirlər. Amma, hüceyrələrdə yalnız erkən embriogenezdə ilkin olaraq repressiya olunan *Hox* genlər repressiya vəziyyətində də qalırlar, hərçənd ki, başqa hüceyrələrdə olan eyni *Hox* genlər eyni Polikomb zülalların iştirakı zamanı fəal olurlar. Nəticədə, mayada susan cütləşən-tipli lokusda olduğu kimi, *Hox* genlərin ekspressiyası nüvə plazmasından diffuziya edən zülallarla spesifik DNT ardıcıllıqlarının qarşılıqlı təsirinin daxil olduğu prosesdən daha çox proseslə tənzimlənir.

Polikomb zülallarla repressiyanın müasir modeli Şəkil 9-48-də verilmişdir. Polikomb zülalların əksəriyyəti, iki çoxzülallı Polikomb repressiv komplekslərin, PRC1 və PRC2-dən birinin subvahididirlər. Güman olunur ki, PRS2 komplekslər əsasən, embriogenezin erkən dövründə öz doğma DNT ardıcıllığına birləşmiş spesifik repressorla və ya sonrakı bölmədə müzakirə olunduğu kimi, uzun kodlaşdırmayan RNT-yə malik olan ribonukleoprotein komplekslə assosasiyada fəaliyyət göstərirlər. PRC2 kompleksi, yuxarıda müzakirə olunduğu kimi, transkripsiyanı ingibirləşdirən histon diasetilazalara malikdir. Onlar həmçinin, *SET domenli* subvahidlərə [*Drpsophila*-da E(z), məməlilərdə EZH2] malikdirlər, bunlar bir sıra histon metil transferazalarda fermentativ cəhətdən fəal olan katalitik domenlərdir. PRC2 komplekslərdə bu SET domen histon H3-ü 27-ci lizində metilləşdirir, iki- və üç-metil lizinləri yaradır. Sonra PRC kompleks, hər biri metilləşmiş H3 lizin 27-ə spesifik olan metil-lizin birləşdirən (*xromodomen* adlanan) domeni olan dimer Pc subvahidlər (məməlilərdə CBX-lər) vasitəsi ilə metilləşmiş nukleosomlarla birləşir. Güman olunur ki, dimer Pc-nin qonşu nukleosomlara birləşməsi, xromatini transkripsiyanı ingibirləşdirən quruluşa kondensasiya edir. Bu elektron mikroskopiya tədqiqatları ilə təsdiqlənir və göstərir ki, PRC1 kompleks nukleosomların in vitro assosasiyasına səbəb olur (Şəkil 9-48d, e).

PRC1 kompleks transkripsiyanı əlavə mexanizmlərlə də repressiya edir. PRC1 kompleks histon H2A-nın C-sonluq quyruğunda lizin 119 nahiyədə H2A-nı *mono*ubikvitinləşdirən (bax Şəkil 8-26) ubikvitin liqazaya da malikdir. H2A-nın bu modifikasiyası, Pol II nukleosomda ranskripsiya edərkən histon oktamerlərin DNT-dən uzaqlaşdırılması və sonra polimeraza keçdikdən sonra, onların əvəz olunması üçün tələb olunan histon çaperon assosasiyasını ingibirləşdirməklə xromatin vasitəsilə Pol II elonqasiyanı ingibirləşdirir. PRC1, yuxarıda müzakirə edilən fəallaşdırma nişanı olan H3 histonun lizin 4 qalığından metil qrupunu spesifik olaraq uzaqlaşdıran histon demetilaza ilə də assosasiya edir.



ŞƏKIL 9-48 Polikomb repressorların repressiya modeli. (a) Embriogenezin erkən dövründə repressorlar PRC2 komplekslə birləşir. (b) Bu birləşmə E(z) subvahidinə malik olan SET-domeni vasitəsi ilə qonşu nukleosomların histon H3 lizin 27 (K27) metilləşməsinə (Me) səbəb olur. (c) PRC1 kompleksi, dimer, xromodomenə malik olan Pc subvahid vasitəsilə H3 lizin 27-də metilləşmiş nukleosomlara birləşir. PRC1 kompleks xromatini repressiya olunmuş xromatin quruluşda kondensasiya edir. PRC2 komplekslər, qonşu histonlarda H3 lizin 27 metilləşməni saxlamaq üçün PRC1 komplekslərlə əlaqəyə girir. Bunun nəticəsində, repressor zülalların (a)-dakı ekspressiyası kəsilərkən bu rayonla PRC1 və PRC2 assosasiyası qorunub saxlanılır. (d, e) 1-kə DNT fraqmentinin, hər beş nukleosoma görə PRC1 kompleksinin iştirak etdiyi (d) və etmədiyi (e) hallarda dörd nukleosomla birləşmiş elektron mikrofotosu. Bax A.H. Lund və M. van Lohuzien, 2004, *Curr.Opn.Cell Biol*. **16**:239 və N.J. Francis, R.E. Kingston and C.L. Woodcock, 2004, *Science*, **306**:1574. [(d) və (e) hissələr AAAS razılığı ilə Francis, N.J. et al., "Chromatin compaction by a polycomb group protein complex, " *Science*, 2004, **306**(5701):1574–7-dən yenidən çap olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc vasitəsilə alınmışdır.]

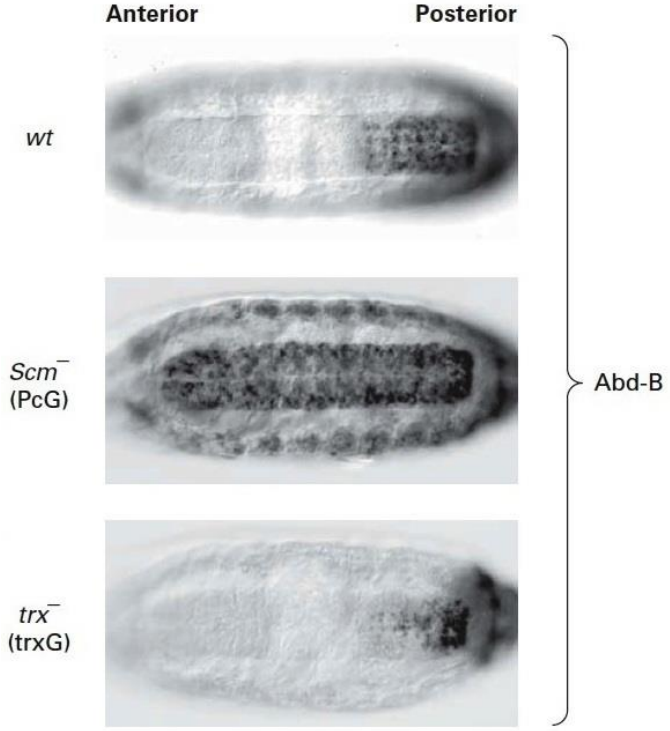
PRC2 kompleks H3 lizin 27 trimetilləşmə nişanını daşıyan nukleosomlarla assosasiya edir, bu nahiyədə nukleodsomda H3 histonda lizin 27-nin metilləşməsini qoruyub saxlayır. Bu metilləşmə, hətta ilkin repressor zülalların Şəkil 9-48a, b-də göstərilən ekspressiyası qırıldıqdan sonra belə, xromatinin PRC1 və PRC2 komplekslərlə asosasiyasının yaranması ilə nəticələnir. Bu assossasiya histon H3 lizin 27 metilləşməsini Şəkil 9-47 diaqramda göstərilmiş analoji mexanizmlə həyata keçirir. Bu mexanizm Polikomb repressiyanın əsas xüsusiyyətidir və orqanizmin həyatı boyu (bəzi onurğalılar üçün ~100 ilə qədər, bəzi şamlar üçün 2000 ilə qədər) ardıcıl hüceyrə bölünməsi zamanı saxlanılır.

Drosophila embrionunda Abd-B Hox transkripsiya faktorunun ekspressiya tədqiqatlarında göstərildiyi kimi, Tritoraks zülalı Polikomb zülalın represssiv mexanizminə əks təsir göstərir (Şəkil 9-49). Normal halda Abd-B inkişafda olan embrionun yalnız arxa (posterior) seqmentində ekspressiya olunur. Polikomb sistem qüsurlu olanda Abd-B embrionun bütün hüceyrələrində ekspressiya olunur. Tritoraks sistem qüsurlu olanda və Polikomb sistemə qarşı əks fəaliyyət göstərə bilməyəndə, embrionun arxasında çox yaxın olan hüceyrələr istisna olmaqla, hüceyrələrin əksəriyyətində Abd-B repressiya olunur. Tritoraks komplekslərə, fəal transkripsiya olunan genlərin promotoru ilə əlaqəli olan histon H3 lizin 4-ü trimetilləşdirən histon metiltransferaza daxildir. Bu histon modifikasiyası histon asetilaza üçün, transkripsiyanı təşkil edən xromatin-remodelinq kompleksi üçün, eləcə də, preinisiasiya kompleksinin yığılmasını inisiasiya edən əsas transkripsiya faktoru TFIID üçün birləşmə saytını yaradır (Şəkil 9-19). H3 lizin 4 metilləşməyə malik olan nukleosomlar, H3 histondan K9 və K27 metilləşməni uzaqlaşdıran, HP1-in və Polikomb repressiya komplekslərinin birləşməsinə mane olan spesifik histon demetilazalar üçün birləşmə mərkəzləridir (saytlarıdır). Həmçinin, güman olunur ki, H3 lizin 4 metilləşməsi ilə işarələnmiş nukleosomlar DNT replikasiyası zamanı hər iki qız DNT molekullarına paylanır, epigenetik işarələnmənin Şəkil 9-47-də göstərilən diaqramdakı strategiyaya oxşar olaraq qorunub saxlanılması ilə nəticələnir.

Metazoanlarda Uzun Kodlaşdırmayan RNT-lər Epigenetik Repressiyanı Yönəldir

Aşkar olunmuşdur ki, repressiya kompleksləri bir-çox kiloəsas uzunluqda olan, uzun açıq oxunan çərçivəyə malik olmayan və ona görə də uzun kodlaşdırmayan RNT-lər və ya lncRNT-lər adlanan RNT molekullarına birləşmiş çoxsaylı represiyaedici zülallar kompleksidir. Bəzi hallarda, dişi məməlilərdə X-xromosomun fəalsızlaşmasında olduğu kimi, bu lncRNT-zülal

kompleksləri eyni xromosomlarda RNT-nin transkripsiya olunduğu bəzi genlərin repressiyası ilə nəticələnir. Bşqa hallarda, repressiya edən bu RNT-zülal kompleksləri trans fəaliyyət göstərərək, lncRNT-nin transkripsiya olunduğu xromosomdan ayrı xromosomlarda olan genləri repressiya edə bilirlər.



ŞƏKİL 9-49 Polikomb və Tritoraks komplekslərin *Drosophila* embrionunda Abd-B Hox transkripsiya faktorunun ekspressiyasına əks təsirləri. *Drosophila* embriogenezinin göstərilən mərhələsində, spesifik anti-Abd-B anticismlə immunorənglənmə yolu ilə yuxarıda göstərildiyi kimi, Abd-B inkişaf etməkdə olan rüşeymin yalnız arxa seqmentlərində olan hüceyrələdə normal ekspressiya olunur. PRC1 komplekslə assosasiyada olan zülalı kodlaşdıran Polikomb gen (PcG) *Scm* homoziqot mutasiya olan rüşeyimlərdə Abd-B-nin ekspressiyası bütün rüşeyim seqmentlərində derepressiya olunur. Əksinə, Tritoraks genin (trxG) *trx* homoziqot mutantlarında Abd-B-nin repressiyası elə artır ki, o yüksək səviyyədə yalnız arxa (posterior) seqmentlərdə ekspressiya olunur. [Klymenko, T., and Muller, J., "The histone methyltransferases Trithorax and Ash1 prevent transcriptional silencing by Polycomb group proteins," *EMBO Reports*, 2004, John Wiley and Sons. Wiley-VCH razılığı ilə yenidən çap olunur.]

Məməlilərdə X-xromosomun Fəalsızlaşması Məməlilərin dişi fərdində X-xromosomun fəalsızlaşması fenomeni (bax Fəsil 8) uzun, zülal-kodlaşdırmayan RNT-lərlə vasitələnən epigenetik repressiyanın ən çox tədqiq olunan nümunələrindən biridir. X fəalsızlaşmaya X xromosom üzərindəki *X-fəalsızlaşma mərkəzi* adlanan, təxminən 100-kə ölçülü domenlə nəzarət olunur. Maraqlıdır ki, bu rayon dişi məməlilərin inkişafının erkən dövründə bütöv X xromosomun təsadüfi fəalsızlaşması üçün tələb olunan bir sıra lncRNT-ləri kodlaşdırır. Bu lncRNT-lərin funksiyaları yalnız qismən başa düşülür. Ən çox intensiv öyrənilənlər X-fəalsızlaşma mərkəzinin ortası yaxınlığında DNT-nin komplementar zəncirindən transkripsiya olunurlar: təxminən 17 kə uzunluqda RNT-yə splays olunan və poliadenilləşən 40-kə TSIX lncRNT və XIST RNT sitoplazmaya eksport olunmur (Şəkil 9-50a).

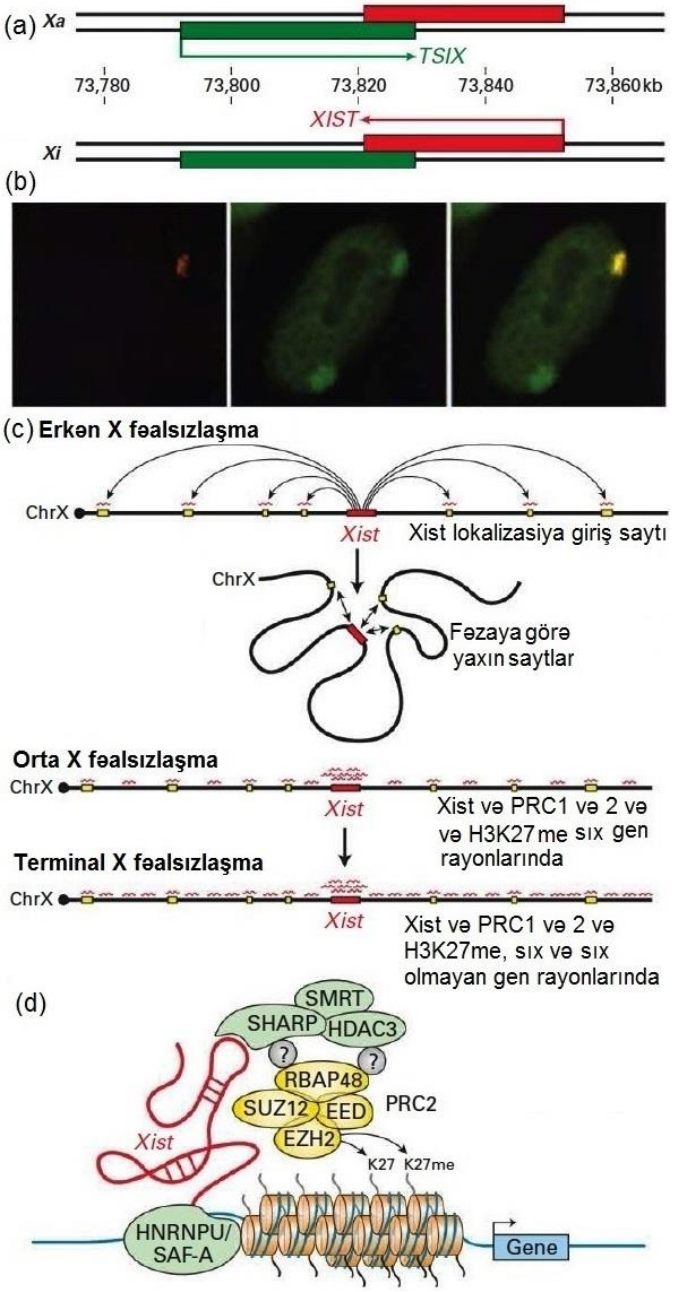
Differensasiya olunmuş qadın hüceyrələrində qeyri fəal X xromosom bütün uzunluğu boyu XIST RNT-zülal kompleksləri ilə assosasiyada olur (Şəkil 9-50b). Kultura olumuş rüşeyim sütun hecyrəsində *Xist* genin hədəfli silinməsi (bax Şəkil 6-39) göstərdi ki, o X fəalsızlaşma üçün tələb olunur. Qeyri-fəal X xromosomda zülal kodlaşdıran genlərin əksəriyyətindən fərqli olaraq Xist əsasən fəal şəkildə transkripsiya olunur. Xist RNT-zülal kompleksləri fəal X xromosomla qarşılıqlı təsiri yaratmaq üçün diffuziya etmirlər, amma, qeyri-fəal X xromosomla assosaiya etmiş vəziyyətdə qalırlar. Qeyri-fəal X xromosomun bütün uzunluğu XIST RNT-zülal kompleksləri ilə örtülü olduğundan (bax Şəkil 9-50b), bu komplekslər, XIST-in transkripsiya olunduğu X-fəalsızlaşma mərkəzində xromosom boyu səpilməlidirlər. XIST-dən fərqli olaraq TSIX qeyri fəal X xromosomdan deyil, fəal X xromosomdan transkripsiya olunur.

Bütün tip hüceyrələrə differensasiya etmək qabiliyyətinə malik olan rüşeym sütun hüceyrələrindən mələ gəlmiş (bax Fəsil 21), siçanın erkən dişi rüşeyimində hər iki X xromosomda olan genlər transkripsiya olunurlar və 40 kə TSIX lncRNT (bax 9-50a) X xromosomun hər iki nüsxəsindən transkripsiya olunur. X-fəalsızlaşdırma mərkəzində yaradılmış silinmələrin (delesiyaların) istifadə edilməsi ilə aparılmış eksperimentlər göstərdi ki, TSIX-in transkripsiyası 17-kə XIST RNT-nin komplementar DNT zəncirindən əhəmiyyətli dərəcədə transkripsiya olunmasına mane olur. Rüşeymin inkişafının sonunda, hüceyrələr differensasiya etməyə başlayan zaman X xromosomların birində TSIX-in transkripsiyası repressiya olunur. Bu repressiya müxtəlif hüceyrələrdə spermadan (X_p) və ya yumurtadan (X_m) törəmiş X xromosomda təsadüfi baş verir. TSIX transkripsiyasının belə ingibirləşməsi hüceyrələrin differensasiyasının davam edəcəyi tərzdə X xromosomların hansının fəalsızlaşacağını təyin edir, çünki TSIX transkripsiyasının ingibirləşməsi həmin xromosomda XIST lncRNT-nin transkripsiyasına imkan yaradır.

Transkripsiya olunan XIST RNT, onun naməlum mexanizmlə X xromosom boyu yayılmasına səbəb olan RNT ardıcıllığına malikdir. Son zamanların tədqiqatları göstərir ki, XIST lncRNT-zülal kompleksləri gələcək X-in üç-ölçülü, bükülmüş quruluşunda (Şəkil 9-50c), xromosom konformasiya tutulması sınağında (bax Şəkil 8-34) olduğu kimi, X xromosomun X-fəalsızlaşma mərkəzinə yaxın zonadakı rayonları ilə assosasiya edir. XIST birləşmənin bu ilkin (başlanğıc) saytlaırı X xromosomun genlə-zəngin rayonunda olur, belə guman edilir ki, "giriş saytı" rolunu oynayırlar və XIST lncRNT-zülal komplekslərinin əlavə nüsxələri əvvəlcə bura birləşir və sonra qonşu rayonlara yayılırlar. Bu yayılmanın mexanizmi hələ tam məlum deyil. Qeyri fəal xromosom, histon H3 lizin 27 trimetilləşməsini kataliz edən PRC2 komplekslə də birləşir. Bu metilləşmə, yuxarıda qeyd edildiyi kimi, PRC1 kompleksin və transkripsiya repressorunun assosasiya etməsi ilə nəticələnir. Amma, transkripsiya repressiyasının bu mexanizmləri lazımsız olmalıdırlar, çünki repressiyalar hələ də PRC1 və PRC2 yığılması üçün zəruri olan Polikomb zülalların olmadığı halda baş verir. Eyni zamanda, TSIX-in fasiləsiz gedən

ekspressiyası digər fəal X xromosomdan davam edir, XIST-in transkripsiyasını bu X xromosomdan repressiya edir və uyğun olaraq fəal X-in XIST-vasitəsilə repressiyasına mane olur. Sonra, XIST və PRC1 və 2 komplekslərin X xromosomun genlə-zəngin olan rayonlarındakı kimi, genlə-kasıb olan rayonları ilə də assosasiya etdiyi müşahidə olunur.

Siçanın kultura olunan embrional sütun hüceyrələrində X fəalsızlaşmanın inisasiya fazasında XIST lncRNT ilə assosasiyada olan zülalların son zamanlar zülal mass spektrometriya vasitəsilə aparılan analizləri (bax Fəsil 3) aşkar etdi ki, hormon olmadıqda tiroid hormonun nüvə reseptorunun ko-repressoru kimi ilk xarakterizə olunan zülal SMRT, XIST RNT ilə qarşılıqlı əlaqədə olan zülal kompleksinin bir hissəsidir. SMRT öz növbəsində histon deasetilaza (HDAC3) ilə əlaqəyə girir. SMRT və HDAC3-ə qarşı yönəldilmiş siRNT-lərlə aparılan sonrakı nokdaun eksperimentləri göstərdi ki, SMRT-ni XIST RNT ilə əlaqələndirən digər identifikasiya olunmuş RNT- və xromatin-birləşdirən zülalların XIST RNT ilə PRC2-nin qeyri-fəal X xromosomla assosasiyası üçün tələb olunduğu kimi, onlar X fəalsızlaşma üçün tələb olunurlar, (Şəkil 9-50d). İnkişafın gedişində az bir zaman sonra, qeyri-fəal X-dakı DNT onun əksər CpG ada promotorlarında metilləşir. Histon H2A-nın *makroH2A* adlanan paraloq H2A ilə əvəz olunduğu xüsusiləşmiş histon oktamerləri qeyri-fəal X ilə birləşmiş vəziyyət alırlar. DNT metilləşməsi və makroH2A embriogenezin sonlarında və bütün yetkin həyat dövründə çoxsaylı hüceyrə bölünməsi yolu ilə qeyri-fəal X-in stabil şəkildə represssiya olunmasına öz töhfəsini verir.



ŞƏKİL 9-50 X-fəalsızlaşdırma mərkəzində kodlaşdırılan Xist uzun kodlaşdırmayan RNT, məməlilərin dişi fərdinin hüceyrələrində qeyri fəal X-xromosomu örtür, qeyri fəal X-da genlərin əksəriyyətinin transkripsiyasını repressiya edir.. (a) İnsanın kodlaşdırmayan Xist (qeyri fəal X-dan transkripsiya olunur) və Tsix (fəal X-dan transkripsiya olunur) RNT-ləri kodlaşdıran X-fəalsızlaşdırma mərkəzi rayonu. (b) İnsanın dişi fərdinin kultura olunan fibroblastı *Xist* RNT-yə komplementar olan, qırmızı flüoressent boya ilə rənglənmiş probla in situ hibridləşmə ilə analiz olunmuşdur (*solda*), X xromosom üçün probların xromosom rəngləmə dəsti yaşıl flüoressent boya (*mərkəzdə*) və iki fluoressent mikrofotonun bir-birini örtməsi ilə ilə nişanlanmışdır. Kondensasiya olunmuş qeyri-fəal X xromosom *Xist* RNT ilə birləşir. (c) Dişi fərdin embrional sütun hüceyrəsində qeyri fəal X xromosomda Xist lncRNT-zülal kompleksin yayılması modeli. Bax E. Heard and A.-V. Gendrel, 2014, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**:561. (d) Xist lncRNT ilə assosasiyada olan zülallar. Sual işarəsi göstərir ki, PRC2 komplekslərin HDAC3 ilə və RNT-birləşdirən zülal SHARP ilə necə assosasiya etməsi hələ məlum deyil. Bax C. A. McHugh et al., 2015, *Nature* 521:232. [(b) hissəsi 1996 C. M. Clemson et al., *The Journal of Cell Biology*, **132**:259–275. doi: 10.1083/jcb.132.3.259.]

Uzun Kodlaşdırmayan RNT-lər vasitəsilə *Trans* Repressiya

Transkripsiyanın uzun kodlaşdırmayan RNT-lərlə repressiyasının başqa bir nümunəsi, son zamanlar tədqiqatçılar tərəfindən insanın kultura olunan fibroblastlarında *HOX* genlər klasterini kodlaşdıran *HOXC* lokus rayonundan transkripsiya olunan kodlaşdırmayan RNT-lərin funksiyasını araşdıranda aşkar olunmuşdur. *HOXC* lokusundan siRNT vasitəsilə ekspressiya olunan 2.2 kə kodlaşdırmayan RNT-nin tükənməsi (Şəkil 6-42), gözlənilmədən *HOXD* lokusun, bu hücyrələrdə bir sıra HOX zülallarını və bir sıra digər kodlaşdırmayan RNT-ləri kodlaşdıran, təxminin 40 kə rayonun başqa bir xromosomda de-repressiyasına səbəb oldu. Xromatin-immunçökdürməyə oxşar olan sınaqlar göstərdi ki, HOTAIR (HOX Antisens genlərarası RNT) adlanan bu kodlaşdırmayan RNT-lər, HOXD lokusla və polikomb PRC2 komplekslə assosasiya edir. Bu assosasiya histon H3 lizin 27-nin di- və trimetilləşməsi, PRC1-in assosasiyası, histon H3 lizin 27 demetilləşməsi, histon H2-nin monoubikvitinləşməsi və transkripsiyanın repressiyası ilə nəticələnir. Bu proses Polikomb kompleksin Xist RNT ilə səfərbər olunmasına oxşardır, amma Xist RNT-nin *cis* vəziyyətində fəaliyyət göstərməsi istisnalıq təşkil edir, o

transkripsiya olunduğu xromosomla birləşmiş vəziyyətdə (assosasiyada) qalır, halbuki HOTAIR başqa bir xromosomun hər iki nüxsəsində *trans* vəziyyətdə Polikomb repressiyaya səbəb olur. Bir daha, *HOXD* lokusun repressiyası üçün lazımsız mexanizmlər mövcud olmalıdır, çünki *HOXD* lokusunda geniş, amma az tamamlanmış repressiya homoziqot HOTAIR nokaut mutasiyalı siçan embrionunun müvafiq hüceyrələrində davam edir.

Uzun Kodlaşdırmayan RNT-lər Vasitəsilə Cis Fəallaşdırma Genlərin fəallaşmasında lncRNT-nin iştirak etdiyi nümunələr son zamanlar xarakterizə olunmuşdur. Məsələn, güman olunur ki, *HOXA* lokusun 5′ ucundan transkripsiya olunan HOTTIP lncRNT histon H3 lizin 4 metilaza ilə birləşərək *HOXA* genlərin fəallaşmasını koordinasiya edir. Bundan başqa, göstərilmişdir ki, lncRNT genlərin yeni sintez olunan transkriptləri transkripsiyanı promotorlardan bir neçə kiloəsas məsafədə Mediator komplekslə əlaqəyə girərək və aradakı xromatini ilgək kimi əyərək onu promotora çatdırmaqla fəallaşdırır.

Aşkar edilmişdir ki, siçanlarda deyil, amma insanlarda *XACT* adlanan lncRNT fəal X xromosomun bütün uzunluğu boyu çoxsaylı saytlarla assosasiya edir və hesab edilir ki, həmin xromosomda gen fəallığının qorunub saxlanılmasına kömək edir. XAST həmçinin ən uzun RNT-lərdən biridir, 252 kə ölçüdədir. O əsasən splays olunmamışdır.

Drosophila-nın erkəklərində və dişilərində X xromosomda kodlaşdırılan genlərin bərabər ekspressiyası (doza kompensasiyası) dişi fərdlərdə tək bir X xromosomun fəalsızlaşmasının nəticəsi deyil. Əksinə, erkəklərdə tək bir X xromosomda genlərin transkripsiyasının fəallaşmasında ümumiləşdirilmiş iki qat artım yalnız erkəyin tək X xromosomundan transkripsiya olunan iki lncRNT, roX1 və roX2 ilə nəzarət olunur. roX1 və roX2 RNT-lər *MSL* (erkək-spesifik-letal) genlər tərəfindən kodlaşdırılan bir sıra zülallarla assosasiya edir və məməlilərdə Xist lncRNT-zülal kompleksinin qeyri fəal X üzərində yayıldığı kimi, spesifik olaraq X xromosom üzərində yayılırlar.

Son zamanlar, insanın çoxsaylı hüceyrə tiplərində ümumi hüceyrə RNT-sinin ardıcıllığının oxunması insanda təxminən 15000 lncRNT identifikasiya etmişdi. Bu lncRNT-lərdən çoxu təkamülcə bütün məməlilərin əksəriyyətində konservativ saxlanılmış ardıcıllığa malikdir, təxminən 5000 yaxın yalnız primatlarda tapılmışdır. Ardıcıllığın belə konservativ saxlanılması möhkəm şəkildə göstərir ki, bu lncRNT-lər XIST, HOTAIR və HOTTIP əhəmiyyətli funksiyaya malikdirlər. Çoxsaylı lncRNT-lər yalnız spesifik hüceyrə tiplərində inkişafın spesifik zamanında ekspressiya olunurlar. Məsələn, çoxsaylı lncRNT-lər ilkin olaraq differensasiya edən qırmızı qan hüceyrələrində ekspressiya olunurlar. Bu lncRNT-lərin bir neçəsinin nokdaunu (bax Şəkil 6-42 və Fəsil 10) normal qırmızı qan hüceyrələrinin inkişaf etməsini ingibirləşdirir, lncRNT-lərin belə vacib funksiyanı necə yerinə yetirdikləri hələ dəqiqliklə məlum deyil. Bu konservativ uzun kodlaşdırmayan RNT-lərin öyrənilməsi və onların gen ekspressiyasına necə təsir etməsi müasir intensiv tədqiqatların başqa bir sahəsidir.

ENCODE (DNT Elementlərin Ensiklopediyası) ABŞ Milli İnsan Genom Tədqiqatları İnstitutunun insanın DNT nəzarət elementlərinin və müxtəlif hüceyrə tiplərində onlara birləşən transkripsiya faktorlarının, ChIP-seq ilə və digər metodlarla xəritələşdirilən histon post-tanslyasiya modifikasiyalarının, DN-aza I hiperhəssas saytların və tənzimləyici lncRNT-lərin və genomda onların assosasiya saytlarının, eləcə də son zamanlar aşkar edilmiş "genin fəal olduğu vəziyyətə nəzarət edən" tənzimləyici elementlərin hərtərəfli, hamı üçün əlçatan verilənlər bazasını qurmaq məqsədi ilə yaratdığı və maliyyələşdirdiyi beynəlxalq tədqiqat qruplarının konsorsiumunu əhatə edir. Nəşr olunmaq üçün həddən artıq böyük olan, insan hüceyrələrinin və model orqanizmlərin hüceyrələrinin verilənlər şəbəkələri də ABŞ Milli Bioinformatika Mərkəzi (NCBI) tərəfindən yaradılan GEO (Gene Expression Omnibus) adlanan saytda ictimaiyyət üçün əldəolunan edilmişdir. RNA-seq və ChIP-seq kiimi genom metodlarına əsaslanan tədqiqatları çap edən jurnallar da tələb edirlər ki, müəlliflər öz orjinal verilənlərini (nəticələrini) GEO-ya yükləsinlər. Dünya miqyasında bu məlumatlara ictimaiyyətin girişi gen tənzimlənməsi sahəsində kəşflərin tezliyini daha da sürətləndirir.

9.7 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Transkripsiyanın Epigenetik Tənzimlənməsi

- Transkripsiyanın epigenetik nəzarəti, hüceyrələr replikasiya etdikdən sonra, DNT metilləşməsinin və ya histonların post-translyasiya modifikasiyasının, xüsusən də histon metilləşməsinin nəticəsi kimi saxlanılan repressiyası və ya fəallaşması hesab edilir.
- Məməlilərdə CpG ada promotorların CpG ardıcıllıqlarının metilləşməsi, histon deasetilazalarla assosasiya edən və promotor rayonunu hiperasetilləşdirən və transkripsiyanı repressiya edən metil-birləşdirən zülallar (MBD-lər) ailəsi üçün birləşmə saytlarını yaradır.
- Histon H3 lizin 9-un di- və trimetilləşməsi heteroxromatinlə-assosasiya edən HP1 zülalı üçün birləşmə saytını yaradır, bu da xromatinin kondensasiyası və transkripsiyanın repressiyası ilə nəticələnir. Bu posttranslyasiya modifikasiyaları sonrakı xromosom replikasiyalarında saxlanılır (daimiləşir), çünki, metilləşmiş histonlar qız DNT molekulları ilə təsadüfi assosasiya edir və qız DNT-sində toplanmış yeni sintez olunan histon oktamerdə histon 3 lizin 9-u metilləşdirən histon H3 lizin 9 metil transferazalarla assosasiya edir.
- Polikomb komplekslər, əvvəlcədən embriogenezin erkən dövründə ekspressiya olunan, ardıcıllıq-spesifik repressorlarla repressiya olunan genlərin repressiyasını qoruyub saxlayır. Polikomb repressiya komplekslərinin bir sinfi, PRC2 erkən rüşeym hüceyrələrində bu repressorlarla birləşir və nəticədə, histon H3 lizin 27-nin metilləşməsinə səbəb olur. Bu metilləşmə PRC2 komplekslərdə və xromatini kondensasiya edən, preinisiasiya komplekslərinin toplanmasını ingibirləşdirən və elonqasiyasını ingibirləşdirən PRC1 komplekslərdə subvahidlər üçün birləşmə saytlarını yaradır. Lizin 27-də metilləşmiş H3-ə malik olan valideyin histon oktamerlər DNT replikasiyasının ardınca hər iki qız DNT molekullarına paylandığından, bu nukleosomlarla birləşmiş PRC2 komplekslər hüceyrə bölünməsi zamanı histon H3 lizin 27 metilləşməsini qoruyub saxlayırlar.

- Polikomb komplekslərin repressiyasına əks fəaliyyət göstərən Tritoraks komplekslər, H3 lizin 4-u metilləşdirməklə fəallaşdırma işarəsini xromosom replikasiyasında saxlyır.
- Dişi məməlilərdə X-xromosomun fəalsızlaşması, X xromosomlardan birinin X-fəalsızlaşma mərkəzindən transkripsiya olunan və sonra hələ da tam anlaşılmayan mexanizmlə eyni xromosomun uzunluğu boyu səpilən (yayılan), Xist adlanan uzun kodlaşdırmayan RNT-ləri (lncRNT) tələb edir. Xist embriogenezin erkən dövründə histon-deasetilaza ilə və PRC2 komplekslə birləşən ko-repressorla qarşılıqlı əlaqəyə girir, X fəalsızlaşmaını inisiasiya edir. X fəalsızlaşma Polikomb komplekslərlə davam edən şəkildə assosasiya etməklə və qeyri-fəal X-da CpG ada promotorlarda DNT metilləşməsi ilə embriogenezin qalan bütün dövrü boyu və bütün yetkin həyat dövründə saxlanılır.
- Bəzi uzun lncRNT-lərin, Xist tərəfindən *cis* vəziyyətdə edilmiş fəalsızlaşmadan fərqli olaraq *trans* vəziyyətdə genlərin repressiyasına səbəb olduğu aşkar edilmişdir. Repressiya onların PRC2 komplekslərlə qarşılıqlı təsiri ilə inisiasiya olunur.
- Bəzi lncRNT-lər gen fəallaşması ilə bağlı olur. lncRNT-lərin spesifik xromosom rayonlarını necə hədəf etməsi barədə çox şeylər hələ öyrənilməmişdir, amma insanın spesifik hüceyrə tiplərində və onların differensasiyasının spesifik mərhələsində ekspressiya olunan 15000 qədər nüvə lncRNT-lərin aşkar edilməsi göstərir ki, lncRNT-lər transkripsiyanın tənzimlənməsində geniş istifadə olunan mexanizmlərini mərkəzində durur.

9.8 Başqa Eukariotik Transkripsiya Sistemləri

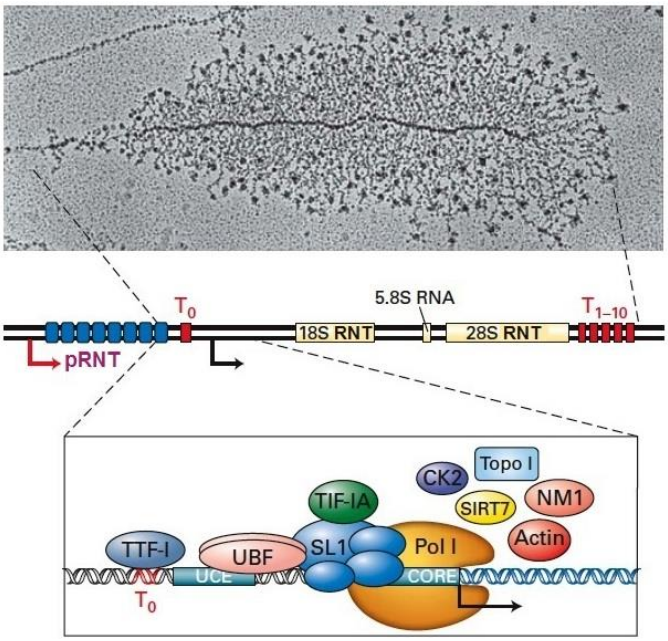
Biz bu fəsli, iki digər eukariotik RNT polimerazaları, Pol I və Pol III ilə transkripsiyanın inisiasiyasının qısa müzakirəsi ilə yekunlaşdırırıq. Mitoxondri və xloroplast DNT-sini transkripsiya edən fərqli polimerazalar Fəsil 12-də hüceyrə energetikasında müzakirə olunacaq. Baxmayaraq ki, bu sistemlər, o cümlədən, onların tənzimlənməsi RNT polimeraza II ilə müqayisədə daha az başa düşülmüşdür, amma onlar da eukariot hüceyrələrin həyatında eyni (bərabər) dərəcədə fundamental əhəmiyyətə malikdirlər.

Transkripsiyanın Pol I və Pol III ilə İnisiasiyası Pol II ilə İnisiasiyaya Analojidir

Pol I və Pol III-ün daxil olduğu transkripsiyanın-inisiasiyası komplekslərinin formalaşması bir çox aspektlərinə görə Pol II inisiasiya komplekslərinin toplanmasına oxşardır (bax Şəkil 9-19). Amma, eukariotların üç nüvə RNT polimerazasının hər biri özünün polimeraza-spesifik əsas transkripsiya faktorlarını tələb edir və fərqli DNT nəzarət elementlərini tanıyır. Bundan başqa, transkripsiyanı inisiasiya etmək üçün DNT templeytda zəncirlərin DNT helikaza ilə ayrılması zamanı Pol II ATP hidrolizini tələb etdiyi halda, nə Pol I nə də Pol III tələb etmir. Pre-rRNT-ni sintez edən Pol I və tRNT-ləri, 5S rRNT-ni və digər qısa stabil RNT-ləri sintez edən Pol III ilə transkripsiyanın inisiasiyası (bax Cədvəl 9-2) hüceyrənin böyüməsi və proliferasiyası tezliyi ilə sıx bağlıdır.

Pol I ilə İnisiasiya Pol I ilə inisiasiyanı istiqamətləndirən tənzimləyici elementlər həm məməlilərdə, həm də maya hüceyrələrində transkripsiyanın start saytına nisbətdə oxşar yerləşirlər. Transkripsiyanın start saytından –40-dan +5-ə qədər sarınan *özək elementlər* (*core elements*) Pol I ilə transkripsiya üçün vacibdirlər. Təxminən –155-dən –60-a qədər uzanan əlavə *yuxarıya istiqamətli tənzimləyici elementlər* in vitro Pol I transkripsiyanı 10 dəfə artırır. İnsanlarda Pol I preinisiasiya kompleksinin toplanması (Şəkil 9-51) UBF-in (yuxarıya istiqamətdə birləşən faktor) və SL1-in (seçim faktoru), TBP-yə malik olan çoxsubvahidli faktorun və dörd Pol I-spesifik TBP-assosasiyalı faktorların (TAF_1-lər) Pol I promoter rayonla kooperativ birləşmələri ilə inisiasiya olunur. TAF_1 subvahidlər Pol I-spesifik subvahidlərlə birbaşa qarşılıqlı təsirdə olaraq bu spesifik nüvə RNT polimerazasını transkripsiyanın start saytına yönəldirirlər. Məməlilərin *S. Cerevisiae*-nin RRN3 homoloqu olan TIF-1A, eləcə də zəngin nüvə proteinkinazası CK2 (kazeinkinaza 2), nüvə aktini, nüvə miyozini, protein-deasetilaza SIRT7 və 14-kə transkripsiya vahidinin Pol I ilə sürətli transkripsiyası zamanı DNT-nin superspirallaşmasının (bax Şəkil 5-8) formalaşmasına mane olan topoizomeraza I digər tələb olunan faktorlardır.

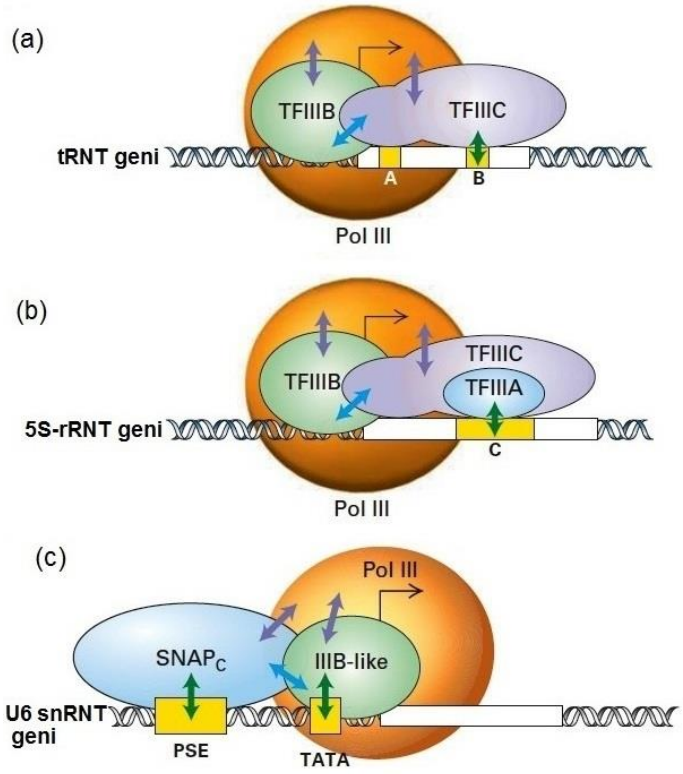
18S, 5.8S və 28S rRNT-lərin 14-kə sələflərinin transkripsiyası (bax Fəsil 10) ribosom sintezini hüceyrənin bölünməsi və artması ilə koordinasiya etmək üçün yüksək səviyyədə tənzimlənir. Bu koordinasiyaya, Pol I inisiasiya faktorlarının fəallıqlarının spesifik saytlarda fosforlaşma və asetilləşmə kimi post-translyasiya modifikasiya yolu ilə tənzimlənməsi, Pol I elonqasiyanın sürətinə nəzarət olunması və, qeyri-fəal nüsxələri heteroxromatində toplanan və transkripsiyası epeigenetik mexanizmlərlə fəal olan, insanın 300 qədər və ya daha artıq rRNT genlərinin sayına nəzarət olunması ilə nail olunur. rRNT genlərinin fəal və heteroxromatik susan (qeyri-fəal) formaları arasında keçid, NoRC ("No" nüvəciyi bildirir, nüvə daxilində rRNT-nin transkripsiya olunduğu sayt) adlanan xromatin-remodelinq kompleksə müşayət olunur. NoRC Pol I transkripsiyanın start saytından yuxarıya doğru nukleosomları tapır, preinisiasiya kompleksinin toplanmasına mane olur. O, həmçinin yuxarıya istiqamətdə nəzarət elementlərində həlledici əhəmiyyətli CpG ardıcıllığını metilləşdirən DNT metil transferaza ilə qarşılqlı əlaqəyə girir, UBF ilə birləşməni və eləcə də histon H3 lizin 9-u di- və trimetilləşdirən biston metil transferazaları ingibirləşdirir, heteroxromatik HP1 və histon deasetilazalar üçün birləşmə saytlarını yaradır. Bundan başqa, rRNT transkripsiya vahidindən təxminən 2-kə yuxarıya doğru (Şəkil 9-51-də qırmızı oxla) Pol I ilə transkripsiya olunan pRNT (birləşdiyi promotora görə) adlandırılan təxminən 250-nukleotid kodlaşdırmayan RNT NoRC subvahidinə birləşir və bu transkripsiyanın susması üçün tələb olunur. Güman edilir ki, pRNT T_0 terminator ardıcıllıqla RNT:DNT tripleksini əmələ gətirməklə NoRC-ni Pol I promotr rayonlarına hədəf edir. Bu, yuxarıya istiqamətdə promotor elementlərində həlledici əhəmiyyətli CpG ardıcıllığını metilləşdirən DNT metil transferaza DNMT3b üçün birləşmə saytını yaradır.



ŞƏKİL 9-51 rRNT-nin sələf RNT-sinin RNT Polimeraza I ilə transkripsiyası. (*Yuxarıda*) Təkrarlanan rRNT genlərinin bir nüsxəsindən transkripsiya olunan RNT zülal komplekslərinin elektron mikrofotosu. (*Ortada*) Tək bir Pol I transkripsiya vahidi. Vahid transkripsiya saytından Pol I transkripsiyanı stimullaşdıran enhanserlər mavi bokslarla göstərilmişdir. Pol I transkripsiyanın Pol I-spesifik terminasiya faktoru TTF-1 ilə birləşmiş terminasiya saytları (T_0, T_1 – T_{10}) qırmızı dördbücaqlılarla göstərilir. pRNT, transkripsiyanın susması üçün tələb olunan kodlaşdırmayan pRNT-nin transkripsiyasını göstərir. Sarı dördbucaqlı kimi göstərilən DNT rayonların ardıcıllıqları 18S, 5.8S və 28S rRNT-lərin prosessinqi zamanı saxlanılır. Qara oxdan qırmızı terminasiya saytlarına qədər transkripsiya olunan başqa rayonlar parçalanaraq atılır. (*Aşağıda*) Əsas promotor elementi və yuxarı nəzarət elementi təsvir olunan Pol I-in və onun əsas transkripsiya faktorları UBF, SL1 və TF-1A və eləcə də Pol I-in elonqasiyası və nəzarət olunması üçün tələb olunan digər zülalların yerləşmələri ilə göstərilmişdir. Bax I. Grummt, 2010, *FEBS J*. **277**:4626. [Electron mikrofoto nəzakətlə Ann L. Beyer tərəfindən.]

Pol III-lə İnisiasiya Zülal kodlaşdıran genlərdən və pre-rRNT genlərindən fərqli olaraq tRNT və 5S rRNT genlərin promotor rayonu bütünlüklə transkripsiya olunan ardıcıllıq daxilində yerləşir (Şəkil 9-52a, b). *A boksu* və *B boksu* kimi adlandırılan iki belə *daxili* promotor elemetləri bütün tRNT genlərində mövcuddur. Yüksək dərəcədə saxlanılmış bu konservativ ardıcıllıqlar yalnız promotor kimi fəaliyyət göstərmir, onlar həmçinin zülalların sintezində tələb olunan eukariotik tRNT-lərin iki invariant hissələrini də kodlaşdırırlar. 5S-rRNT genlərində vahid daxili nəzarət rayonu olan *C boks*, promotor kimi fəaliyyət göstərir.

tRNT və 5S rRNT genlərinin in vitro transkripsiyasının Pol III ilə inisiasiyası üçün üç əsas transkripsiya faktorları tələb olunur. İki multimer faktorlar, TFIIIC və TFIIIB həm tRNT həm də 5S-rRNT promotorlarla inisiasiyada iştirak edirlər, üçüncü faktor, TFIIIA isə yalnız 5S-rRNT promotorunda inisiasiya zamanı tələb olunur. Pol I və Pol II inisiasiya komplekslərinin toplanmasında olduğu kimi, Pol III əsas transkripsiya faktorları müəyyən nukleotid ardıcıllığında promotor DNT-yə birləşir.



ŞƏKIL 9-52 RNT polimeraza III ilə transkripsiya olunan genlərdə transkripsiyanın nəzarət elementləri. Həm tRNT (a) həm də 5S-rRNT (b) genləri, start saytdan aşağıya doğru yerləşmiş və göstərildiyi kimi A, B və C bokslar adlandırılan daxili promoter elementlərinə malikdirlər (sarı). Bu genlərdə transkripsiyanın inisasiyası komplekslərinin toplanması Pol III-spesifik əsas transkripsiya faktorlarının TFIIIA, TFIIIB və TFIIIC-nin bu nəzarət elementlərinə birləşməsi ilə başlanır. Yaşıl oxlar, ardıcıllıq-spesifik möhkəm zülal-DNT qarşılıqlı əlaqələrini göstərir. Mavi oxlar əsas transkripsiya faktorları arasındakı qarşılıqlı əlaqələri göstərir. Bənövşəyi oxlar əsas transkripsiya faktorları ilə Pol III arasındakı qarşılıqlı əlaqələri göstərir. (c) Məməlilərdə U6 snRNT geninin transkripsiyası, alternativ BRF subvahidi ilə TFIIIB-nin xüsusi forması olan TBP subvahidinin birləşdiyi yuxarı istiqamətdə olan TATA bokslu promotorla və $SNAP_C$ adlanan çoxsubvahidli faktorla birləşən PSE adlanan yuxarı istiqamətdə olan tənzimləyici elementlərlə nəzarət olunur. Bax L. Schramm and N. Hemandez, 2002, *Gene Dev*. **16**:2593.

TFIIIB subvahidlərin birinin N-sonluğunun *BRF* (TFIIB ilə əlaqəli faktor) adlanan yarısı ardıcıllığına görə TFIIB (Pol II faktor) ilə oxşardır. Bu oxşarlıq göstərir ki, BRF və TFIIB inisiasiyada eyni funksiyanı həyata keçirirlər, məhz, transkripsiyanın start saytında templeyt DNT zəncirlərinin ayrılmasına kömək edirlər. TFIIIB tRNT və ya 5S-rRNT genlərindən hər hansı birinə birləşdikdən sonra Pol III birləşə və transkripsiyanı ribonukleozid trifosfatların iştirakı ilə inisiasiya edə bilir. TFIIIB-nin BRF subvahidi spesifik nüvə RNT polimerazası ilə transkripsiyanı inisiasiya etmək üçün polimerazanın Pol III üçün unikal olan subvahidlərindən biri ilə xüsusi əlaqəyə girir.

TFIIIB-ni təşkil edən üç subvahidin başqa biri, TBP, bizim gördüyümüz kimi, bütün eukariotik nüvə RNT polimerazalar üçün ümumi olan transkripsiya faktorunun komponentidir. Pol I və Pol III ilə transkripsiyanın inisiasiyasında TBP-nin iştirak etməsinin aşkar olunması gözlənilməz oldu, çünki bu fermentlərlə tanınan promotorlar çox vaxt TATA boksa malik olmurlar. Bununla belə, Pol III ilə transkripsiya olunan zaman, TFIIIB-nin TBP subvahidi transkrisiyanın start saytından təxminən 30 əc yuxarıya doğru DNT ilə, TATA bokslarla yaratdığı qarşılıqlı əlaqə kimi əlaqyə girir.

Pol III həmçinin, kiçik stabil RNT-lərin də genlərini TATA boksa malik olan yuxarıya istiqamətdə yerləşən promotorlarla transkripsiya edir. Buna bir nümunə, Fəsil 10-da müzakirə olunduğu kimi, pre-mRNT-nin splaysinqində iştirak edən U6 snRNT-ni göstərmək olar. Məməlilərdə bu gen, TATA boksdan başqa, yuxarıya istiqamətdə PSE adlanan promotor elementlərinə da malikdir (Şəkil 9-52c). PSE, $SNAP_C$ adlanan çoxsubvahidli kompleklə birləşir, halbuki TATA boks alternativ BRF subvahidinə malik olan TFIIIB-nin xüsusi formasının subvahidi olan TBP ilə birləşir.

MAF1 Pol III transkripsiyanın spesifik ingibitorudur, TFIIIB-nin BRF subvahidi və Pol III ilə qarşılıqlı əlaqə yaradaraq fəaliyyət göstərir. Onun funksiyası, onun sitoplazmadan nüvəyə daşınmasına, hüceyrənin stresə və qida çatışmazlığına cavabı kimi proteinkinaza kaskadları ilə siqnal ötürülməsi yoluna cavab olaraq (bax Fəsil 16 və 24), xüsusi saytlarında fosforlaşması yolu ilə nəzarət olunmaqla tənzimlənir. Məməlilərdə Pol III transkripsiya, kritik şiş (tumor) supressorları p53 və retinblastoma (Rb) ailəsi ilə də repressiya olunur. İnsanlarda RNT polimeraza III-ün RPC32 subvahidini kodlaşdıran iki gen vardır. Bunlardan biri xüsusi olaraq replikasiya edən hüceyrələrdə ekspressiya olunur və onun məcburi ekspressiyası insanın kultura olunan fibroblast hüceyrələrinin onkogen transformasiyasına kömək edir.

9.8 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Başqa Eukariotik Transkripsiya Sistemləri

- Pol I və Pol III ilə transkripsiyanın inisiasiyası prosesi Pol II ilə olan prosesə oxşardır, amma, fərqli transkripsiya faktorlarını tələb edirlər, fərqli promoter elementləri ilə istiqamətləndirilirlər və start saytında DNT zəncirlərinin ayrılması üçün ATP β-γ fosfodiefir əlaqələrinin hidrolizini tələb etmirlər.
- Pol I pre rRNT geninin çoxsaylı nüsxələrindən yalnız bir RNT-ni, 18S, 5.8S və 28S rRNT-nın 45S sələfini transkripsiya edir.
- Pol III tRNT-ləri bütün tRNT-lər üçün ümumi olan tRNT rayonlarını kodlaşdıran gen daxilində yerləşən promotordan transkripsiya edir. Bu daxili promoter TFIIIC transkripsiya faktoruna birləşir, o isə öz növbəsində transkripsiyanın start saytından təxminən 30 əsas cütü yuxarıya istiqamətdə tRNT geni ilə assosasiya edən, TATA-boks birləşdirən zülal TBP-nin daxil olduğu çoxsubvahidli faktor TFIIIB ilə birləşir.
- Pol III 5S-rRNT kodlaşdıran rayon daxilində yerləşən transkripsiya faktoru TFIIIA ilə birləşmiş promotorla istiqamətlənən 5S rRNT-ni transkripsiya edir. TFIIIA sonra tRNT-nin transkripsiyasında olan qarşılıqlı təsir kimi, Pol III ilə qarşılıqlı əlaqədə olan TFIIIC və TFIIIB ilə assosasiya edir.
- Bu vaxta qədər funksiyası hələ tam məlum olmayan bir sıra əlavə kiçik stabil RNT-lər dərhal genin yuxarı hissəsinə birləşən TBP-birləşdirən transkripsiya faktorlarının idarəsi altında Pol III ilə transkripsiya olunurlar (bax Şəkil 9-52).
- Pol III transkripsiya xüsusi ingibitorla, sitoplazmadan nüvəyə daşınması qidalanmanın mümkünliyinə cavab olaraq nəzarət olunan MAF1 ilə tənzimlənir.

Açar Sözlər

aktivatorlar
antiterminasiya faktorı
bromodomen
DN-aza I futprintinq
emhanserlər
enhanseosom
əsas transkripsiya faktorları
fəallaşdırma domeni
histon deasetilləşməsi
xromatinlə-vasitələnən repressiya
xromodomen
istilik-şoku genləri
karboksil-sonluq domeni (CTD)
ko-aktivator
ko-repressor
leysin zipper
MAT lokus (mayada)
mediator
nüvə reseptorları
promotor
promotora-yaxın (-proksimal) elementlər
repressiya domeni
repressorlar
RNT polimeraza II
saylənser (susduran) ardıcıllıqlar
sink barmaq
spesifik transkripsiya faktorları
TATA boks
TATA boks birləşdirən zülal (TBP)
yuxarıya istiqamətdə fəallaşma ardıcıllıqları (UAS-lər)

Konsepsiyalara Baxış

1. *E.coli* hüceyrələri tərkibində qlükoza olan mühitdən laktoza olan mühitə keçirilərkən *lac* operonda baş verən molekulyar hadisələri təsvir edin.
2. Qlutaminin qatılığı *E.coli*-də sərbəst qlutamin-sintetaza fermentinin transkripsiyasına təsir edir. Bunun mexanizmini təsvir edin.
3. Xatırladaq ki, triptofan zəngin olanda *trp* repressor triptofan istehsal edəın genlərdə operator rayonundakı sayta birləşir və bununla transkripsiyaya mane olur. Triptofanın biosintezi fermentlərinin genlərinin ekspressiyasında aşağıdakı ssenarilərdə nə baş verəcək? Boş buraxılmış yerləri bu ifadələrdən biri ilə doldur:

heçvaxt ekspressiya olunmayacaq / həmişə (davam edən tərzdə) ekpressiya olunacaq

a. Hüceyrə, operatora birləşə bilməyən mutant *trp* repressoru istehsal edir. Ferment genləri_____.

b. Hüceyrə, hətta triptofan olmayan halda belə onun operator saytına birləşə bilən mutant *trp* repressoru istehsal edir. Ferment genləri_____.

c. Hüceyrə, promoter rayonuna birləşə bilməyən mutant siqma faktorunu istehsal edir. Ferment genləri_____.

d. Rayon 1 transkripsiya olunuqdan sonra, aparıcı ardıcıllığın elonqasiyası həmişə dayandırılır. Ferment genləri_____.

4. Bakterial və eukariot gen ekspressiyası mexanizmlərini müqayisə et və qarşı-qarşıya qoy.
5. RNT polimerazalar I, II və III vasitəsi ilə hansı tip genlər transkripsiya olunurlar? RNT polimeraza II vasitəsi ilə spesifik genin transkripsiya olunub-olunmadığını təyin edən eksperimenti təsvir edin.
6. RNT polimeraza II-nin ən böyük subvahidində CTD çoxsaylı serin qalıqlarında fosforlaşa bilir. Fosforlaşmamış RNT polimeraza II CTD-nin əksinə fosforlaşmaya aparan şəraitlər hansılardır?
7. TATA bokslar, inisiatorlar və CpG adalar hansı ümumi xüsusiyyətə malikdirlər? Bunlardan hansı birinci aşkar olunmuşdur? Niyə?
8. Genlərdə promotora-yaxın rayonlarda DNT-nəzarət elementlərinin yerləşməsini identifikasiya edən metodu təsvir et.
9. Promotora-yaxın elementlə uzaq enhanser arasında fərq nədən ibarətdir? Onların oxşarlıqları nədir?
10. Genlərin tənzimləyici rayonlarında DNT-birləşdirən zülalların yerlərini identifikasiya etməkdə istifadə olunan metodları təsvir et.
11. Transkripsiyanın aktivatoru və repressoru zülallarının quruluş xüsusiyyətlərini təsvir et.
12. Gen-kodlaşdıran ardıcıllıqları dəyişmədən genlərin ekspressiyasının necə repressiya oluna biləcəyinin iki nümunəsini göstər.
13. CREB və nüvə reseptorlarını nümunə kimi istifadə edərək, transkripsiya faktoru öz ko-aktivatorlarına birləşərkən baş verən quruluş dəyişikliklərini müqayisə et və fərqini göstər.
14. Polimerazadan başqa hansı əsas transkripsiya faktorları RNT polimeraza II promotoru ilə birləşir? Onlar hansı ardıcıllıqla in vitro birləşirlər? Transkripsiyanın-inisiasiyasının "açıq" kompleksi yaranarkən DNT-də hansı quruluş dəyişiklikləri baş verir?
15. Mayada rekombinant zülalların ekspressiyası insan istifadəsi üçün tələb olunan yeni dərmanları istehsal edən biotexnoloji kompaniyalar üçün çox əhəmiyyətli vasitədir. Mayada ekspressiya olunan yeni *X* genini əldə etmək üçün edilən cəhdlərdə, tədqiqatçı *X* genini maya genomuna telomer yaxınlığında inteqrasiya etdi. Bu strategiya *X* genin yaxşı ekspressiyası ilə nəticələnəcəkmi? Nəyə gör hə, və ya nəyə görə yox? Əgər eksperiment H3 və ya H4 histon quyruqlarında mutasiyaya malik olan maya xəttində yerinə yetirilmişsə bu eksperimentin nəticəsi fərqlənəcəkmi?
16. Siz, STICKY adlanan yeni zülalı ayırmısınız. Siz məlum olan başqa zülallarla müqayisəyə əsasən əvvəlcədən deyə bilərsiniz ki, STICKY bHLH domeninə və Sin3 qarşılıqlı-təsir domeninə malikdir. STICKY-nin funksiyasını qabaqcadan deyin və STICKY-nin funksiyasında bu domenin əhəmiyyətini əsaslandırın.
17. Prokariotlar və maya kimi ibtidai eukaritlar, yuxarıya-istiqamətdə fəallaşdırıcı ardıcıllıqlar adlanan DNT-tənzimləyici elementlərə malikdirlər. Ali eukariot növlərində hansı müqayisə oluna bilən ardıcıllıqlar tapılmışdır?
18. Siz, gen ekspressiyasında enhanser kimi fəaliyyət göstərən *X* geni ardıcıllığı rayonunu təyin etmək üçün maraqlısınız. Bu məsələni tədqiq etmək üçün eksperimenti təsvir edin.
19. Bəzi orqanizmlər transkripsiyanın terminasiyasının üstündən keçən mexanizmlərə malikdirlər. Belə bir mexanizmi istifadə edən Tat zülal HIV retroviruslar tərəfindən istfadə olunur. İzah edin, nəyə görə HIV-ə qarşı peyvənd üçün Tat yaxşı hədəfdir.
20. Verilmiş genin translyasiyası üçün məsul olan DNT tənzimləyici ardıcıllığın təyinində siz gördünüz ki, o CG ardıcıllıqla zəngindir. Müvafiq gen yüksək dərəcədəmi ekspressiya olunan transkriptdir?
21. Transkripsiyanın nəzarət olunmasına məsul olan DNT-birləşdirən zülalların dörd əsas sinifinin adını deyin və onların quruluş xüsusiyyətlərini təsvir edin.

İstinadlar

Bakteriyalarda Gen Ekspressiyasına Nəzarət

Bush, M., and R. Dixon. 2012. The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of σ54-dependent transcription. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **76**:497–529.

Casino, P., V. Rubio, and A. Marina. 2010. The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **20**:763–771.

Fürtig, B., et al. 2015. Multiple conformational states of riboswitches fine-tune gene regulation. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **30**:112–124.

Muller-Hill, B. 1998. Some repressors of bacterial transcription. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:145–151.

Eukariotik Gen Nəzarətinə Ümumi Baxış Djebali, S., et al. 2012. Landscape of transcription in human cells. *Nature* **489**:101–108.

Kellis, M., et al. 2014. Defining functional DNA elements in the human genome. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **111**:6131–6138.

RNT Polimeraza II Promotorlar və Əsas Transkripsiya Faktorları

Sainsbury, S., C. Bernecky, and P. Cramer. 2015. Structural basis of

transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16:129–143.

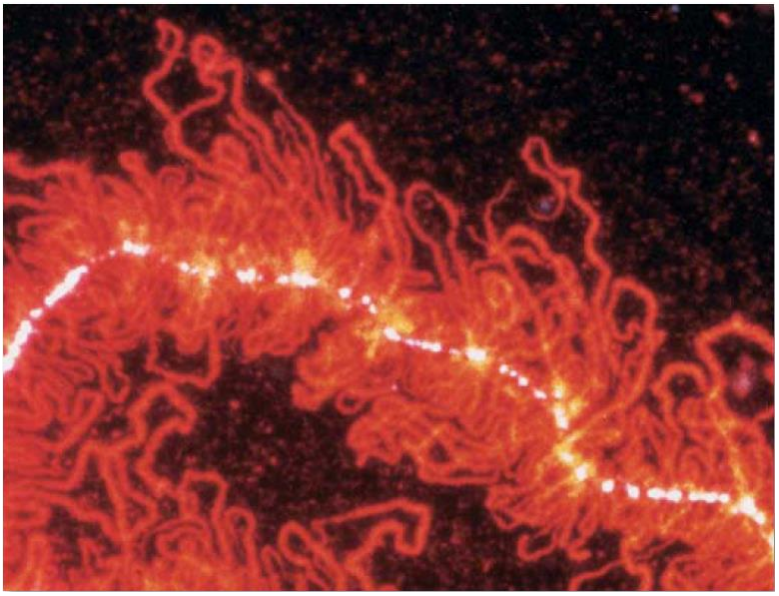
Zülal-Kodlaşdıran Genlərin Tənzimləyici Ardıcıllıqıarı və Onların Fəaliyyət Göstərdikləri Zülallar
de Wit, E., and W. de Laat. 2012. A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization. *Genes Dev.* **26**:11–24.
ENCODE Project Consortium. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**:57–74.
Vaquerizas, J. M., et al. 2009. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat. Rev. Genet.* **10**:252–263.

Transkripsiyanın Repressiyası və Fəallaşmasının Molekulyar Mexanizmləri Berger, S. L. 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**:407–412.
Malladi, V. S., et al. 2015. Ontology application and use at the ENCODE DCC. Database (Oxford). doi: 10.1093/database/bav010.
Plaschka, C., et al. 2015. Architecture of the RNA polymerase II-Mediator core initiation complex. *Nature* **518**:376–380.
Rothbart, S. B., and B. D. Strahl. 2014. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim. Biophys. Acta* **1839**:627–643.
Zaret, K. S., and J. S. Carroll. 2011. Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev.* **25**:2227–2241.

Transkripsiya-Factoru Fəallığının Tənzimlənməsi Kirschke, E., et al. 2014. Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. *Cell* **157**:1685–1697.

Transkripsiyanın Epigenetik Tənzimlənməsi Derrien, T., et al. 2012. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* **22**:1775–1789.
Gendrel, A. V., and E. Heard. 2014. Noncoding RNAs and epigenetic mechanisms during X-chromosome inactivation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**:561–580.
Klose, R. J., and A. P. Bird. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* **31**:89–97.
McHugh, C. A., et al. 2015. The Xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3. *Nature* **521**:232–236.

Başqa Eukariotik Transkripsiya Sistemləri Moir, R. D., and I. M. Willis. 2015. Regulating maf1 expression and its expanding biological functions. *PLoS Genet.* **11**:e1004896.



Nophtalmus viridescens tritonun oositində “Lampbrush chromosome”-un hissəsi; yeni sintez olunan RNT transcriptlə birləşmiş hnRNP zülalın monoclonal anticisimlə rəngləndikdən sonra fluoressyensiyası. [Nəzakətlə M. Roth və J. Gall tərəfindən.]

FƏSİL

10

Post-Transkripsiya Gen Nəzarəti

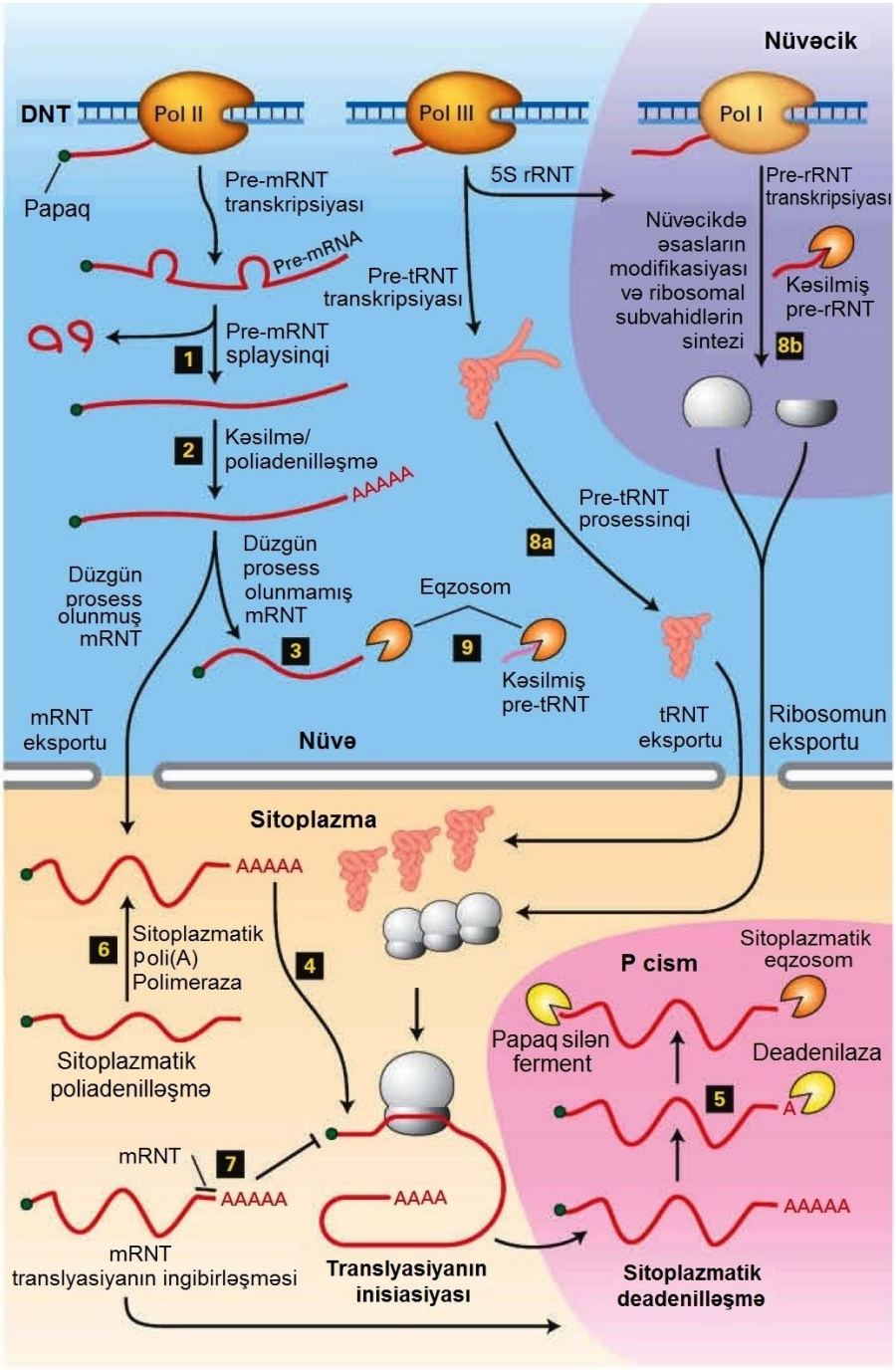
Əvvəlki fəsildə, biz gördük ki, genlərin əksəriyyətinin tənzimlənməsi gen ekspressiyasının birinci mərhələsində, transkripsiya zamanı, transkripsiyanın preinisiasiya kompleksinin promotor DNT ardıcıllığında toplanmasını tənzimləməklə və promoter-proksimal rayonda transkripsiyanın elonqasiyasını tənzimləməklə həyata keçirilir. Transkripsiya inisiasiya olunduqdan sonra, kodlaşdırılan RNT-nin sintezi tələb edir ki, RNT polimeraza geni bütöv transkripsiya etsin və vaxtından əvvəl, yetişməmiş terminasiya etməsin. Bundan əlavə, eukariotik genlərdən istehsal olunan **ilkin əsas transkriptlər** uyğun funksional RNT-ləri almaq üçün müxtəlif prosessinq reaksiyalarına məruz qoyulmalıdırlar. mRNT-lərdə translyasiya üçün əhəmiyyətli olan 5′ papaq quruluş əlavə olunmalıdır (bax Şəkil 5-14), intronlar mRNT-lərdən uzaqlaşdırılmalıdır və 3′ sonluq poliadenilləşməlidir (bax Şəkil 5-15). Nüvədə yetişmiş funksional RNT-lər yarandıqdan sonra ribonukleozülalların komponenti kimi sitoplazmaya eksport olunurlar. Həm RNT-nin prosessinqi, həm də onların nüvədən daşınması gen ekspressiyasının transkripsiyanın inisiasiyasından sonrakı tənzimlənməsi imkanlarını tələb edir.

Son zamanlar, insanın müxtəlif toxumalarında və embriogenezin və hüceyrə differensasiyasının müxtəlif dövrlərində ekspressiya olunan mRNT-lərin ardıcıllıqları üzrə əldə olunan böyük miqdarda məlumatlar aşkar etdi ki, insan genlərinin 95 faizə qədəri alternativ splays olunmuş RNT-lərin yaranmasına səbəb olur. Bu alternativ splays olunan mRNT-lər, spesifik funksional domenlərlə məhdudlaşan ardıcıllıqlarına görə fərqləri olan müvafiq zülalları kodlaşdırırlar. Çox hallarda, alternativ RNT splaysinqi, xüsusi hüceyrə tipində spesifik zülal izoformasına olan ehtiyacın ödənilməsi üçün tənzimlənir. Pre-mRNT splaysinqinin mürəkkəbliyini nəzərə alaraq, təəccüblü deyildir ki, vaxtdan-vaxta edilən səhvlər düzgün splays olunmamış eqzonlara malik olan mRNT sələflərin yaranmasına səbəb olur. Amma, eukariotik hüceyrələr RNT nəzarət mexanizmini inkişaf etdirərək, bu düzgün prosess olunmayan RNT-lərin sitoplazmaya daşınmasına mane olur və ya əgər daşınmışsa onların parçalanmasını həyata keçirirlər.

Gen ekspressiyasının əlavə nəzarəti sitoplazmada baş verə bilir. Məsələn, zülal-kodlaşdıran genlərdə, istehsal olunan zülalların miqdarı sitoplazmada olan müvafiq mRNT-lərin stabilliyindən və onların translyasiya sürətindən asılı olur. Məsələn, immun cavab reaksiyası zamanı limfositlər sitokinlər adlanan polipeptid hormonları ifraz etməklə əlaqə yaradırlar, siqnal qonşu limfositlərə, onların plazma membranına sarınan sitokin reseptorlar vasitəsilə ötürülür (bax Fəsil 23). Limfositlərin sitokinləri qısa impulslarla sintez etməsi və ifraz etməsi çox əhəmiyyətlidir. Bu, sitokin mRNT-sinin həddən artıq qeyri stabil olduğuna görə mümkündür. Nəticədə, onun sintezi dayanan kimi sitoplazmada mRNT-nin qatılığı kəskin şəkildə düşür. Bunun əksinə, uzun müddət fəaliyyət göstərən böyük miqdarda tələb olunan zülalları, məsələn ribosom zülallarını kodlaşdıran mRNT-lər çox stabildirlər, ona görə də, hər bir belə mRNT-dən çoxsaylı polipeptidlər translyasiya olunur.

QISA İCMAL

10.1 Eukariot Pre-mRNT-nin prosessinqi
10.2 Pre-mRNT prosessinqinin tənzimlənməsi
10.3 mRNT-nin nüvə qabığından keçərək daşınması
10.4 Post-transkripsiya nəzarətinin sitoplazmatik mexanizmləri
10.5 rRNT-nin və tRNT-nin prosessinqi



ŞƏKİL 10-1 RNT prosessinqi və post-transkripsiya gen nəzarətinə ümumi baxış. Bütün sitoplazma RNT-lərinin demək olar ki, hamısı sitoplazmaya eksport olunmazdan öncə nüvədə ilkin transkriptdən prosess olunurlar. RNT polimeraza II ilə transkripsiya olunan zülal kodlaşdıran genlər üçün gen nəzarəti pre-mRNT splaysinqi zamanı alternativ eqzonların seçilməsi (pillə 1) və alternativ poli(A) saytının seçilməsi (pillə 2) ilə həyata keçə bilər. Düzgün prosess olunmayan mRNT-lərin sitoplazmaya eksport olunmasının qarşısı alınır (pillə 3) və çoxsaylı ribonukleazalara malik olan exosome adlanan böyük kompleksdə parçalanır. Sitoplazmaya eksport olunduqdan sonra (pillə 4), translyasiyanın inisiasiyası faktorları 5′-papağa birləşir, poli(A) quyruğa birləşmiş poli(A) birləşdirən zülal I-lə kooperativ şəkildə mRNT-də translyasiyanı inisiasiya edir (bax Şəkil 4-28). mRNT sitoplazmada papağı itirərərək (pillə 5) və deadenilləşmə yolu ilə parçalanır, ardınca da sitoplazmada eqzosomlarda dağılır. Bu proseslər sitoplazmanın translyasiyanın repressiyası kimi fəaliyyət göstərən P cismlər adlanan sıx rayonunda sürətlə baş verir. Hər bir mRNT-nin parçalanma dərəcəsi nəzarət olunur, bununla da mRNT qatılığı və nəticədə translyasiya olunan zülalın qatılığı tənzimlənir. Bəzi mRNT-lər uzun poli(A) quyruqsız sintez olunurlar. Onların translyasiyası, sitoplazmatik poli(A) polimeraza ilə (pillə 6) uzun poli(A) quyruqların sintezinə nəzarət olunmaqla tənzimlənir. Translyasiya həmçinin miRNT-nin daxil olduğu başqa mexanizmlərlə də tənzimlənir (pillə 7). Ekspressiya olunarkən, bu ~22 nukleotid RNT-lər, adətən 3′ translyasiya olunmayan rayonda hibridləşmə yolu ilə mRNT-nin translyasiyasını ingibirləşdirirlər. tRNT-lər və rRNT-lər də sələf RNT-lər kimi sintez olunurlar və (pillə 8) funksional olmamışdan öncə prosessinq olunmalıdırlar. Yetkin mRNT-dən doğranıb ayrılmış sələf RNT-nin rayonları (pillə 9) nüvə eqzosomları ilə parçalanırlar. Bax Houseley et al., 2006, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol*. **7**:529.

Məhz pro-mRNT-nin prosessinqinin, nüvədən eksportunun və translyasiyasının tənzimlənməsi kimi, yeni sintez olunmuş çox mRNT-lərin, bəlkə də böyük əksəriyyətinin hüceyrədə yerləşməsi elə tənzimlənir ki, yeni sintez olunmuş zülalların qatılıqları onlara ehtiyac olan yerlərdə artır. Bu tip tənzimlənmənin xüsusilə parlaq nümunələri çoxhüceyrəli heyvanların sinir sistemində meydana çıxır. İnsan beyninin bəzi neyronları başqa neyronlarla mindən artıq sinapsisləri əmələ gətirir. **Öyrənmə** prosesi zamanı, başqalarına nisbətən daha tez-tez yaranan sinapsislər ölçülərinə görə başqalarından dəfələrlə çox böyük olur, amma eyni neyronların yaratdığı sinapslar böyümürlər. Bu ona görə baş verir ki, sinapsların böyüməsi üçün kritik əhəmiyyətli olan zülalları kodlaşdıran mRNT-lər bütün sinapslarda saxlanılır, amma bu lokallaşdırılmış, saxlanılan mRNT-lərin translyasiyası hər sinapsda müstəqil olaraq sinaps siqnallarının tezliyi ilə tənzimlənir. Bu yolla, sinapsla-assosasiya edən zülalların sintezi eyni neyronların əmələ gətirdiyi çoxsaylı sinapsların hər birində ayrıca tənzimlənir (bax Fəsil 22).

Gen tənzimlənməsinin, başqa bir tipinə, çoxhüceyrəli heyvanlarda və bitkilərdə xüsusi hədəf mRNT-nin translyasiyasının sabitliyini tənzimləyən mikro RNT-lərlə (miRNT) tənzimlənmə daxildir. İnsanın müxtəlif toxumalarında bu qısa miRNT-lərin analizi göstərir ki, insanın müxtəlif tipli hüceyrələrində ekspressiya olunan 1900-dən artıq müxtəlif miRNT-lər vardır. Hərçənd ki, son zamanlar aşkar olunmuşdur ki, onların bəziləri müvafiq toxumada, inkişafın müvafiq zamanında hədəf genin ingibirləşməsi ilə fəaliyyət göstərirlər, amma insanın miRNT-lərinin əksər çoxluğunun funksiyası hələ məlum deyil və getdikcə genişlənməkdə olan yeni tədqiqat sahəsinin mövzusuna çevrilir. Əgər, həqiqətən miRNT-lərin əksəriyyəti əhəmiyyətli funksiyaya malikdirsə, miRNT genləri 25000-dən artıq insan genlərinin çox əhəmiyyətli bir bölməsini təşkil edirlər. RNT müdaxiləsi adlandırılan (RNTi) çox yaxın olan digər bir prosess, yoluxmuş hüceyrələrdə virus RNT-lərinin parçalanmasına və çoxsaylı eukariotlarda transpozonla-kodlaşdırılan RNT-lərin parçalanmasına səbəb olur. Bu kəşf bioloji tədqiqatlarda həddən artıq böyük əhəmiyyə kəsb edir, çünki **qısa müdaxilə RNT-lərini** (siRNT) dizayn etməklə eksperimental olaraq spesifik mRNT-lərin translyasiyasını, ***RNT nokdaun*** adlanan proseslə ingibirləşdirmək mümkündür. Bu metod, hətta klassik genetik metodlarla mutantların ayrılması mümkün olmayan orqanizmlərdə də istənilən nəzərdə tutulan genin funksiyasını ingibirləşdirməyə imkan verir.

Transkripsiyanın ardınca gen ekspressiyasının tənzimlənməsində iştirak edən bütün metodları biz *post-transkripsiya gen nəzarəti* kimi adlandırırıq (Şəkil 10-1). mRNT-nin stabilliyi və translyasiyasının sürəti ekspressiya olunan zülalın miqdarının artmasına səbəb olduğundan, bu post-transkripsiya prosesləri gen nəzarətinin əhəmiyyətli komponentləridir. Həqiqətən də, genlərin zülal məhsulu mRNT-nin sintezindən onun parçalanmasına qədər mövcud olduğu hər bir mərhələsində tənzimlənir. Beləliklə, genetik tənzimləmə prosesləri həm RNT, həm də DNT üzərində fəaliyyət göstərir. Bu fəsildə biz, transkripsiyanın inisasiyasından və promotor-proksimal elonqasiyadan sonra mRNT-nin prosessinqi ilə əlaqədar olan hadisələri və bu hadisələri tənzimləyən müxtəlif mexanizmləri öyrənməyi nəzərə alırıq. Axırıncı bölmədə, biz, rRNT-ləri və tRNT-ləri kodlaşdıran genlərin ilkin transkriptlərinin prosessinqini qısaca müzakirə edirik.

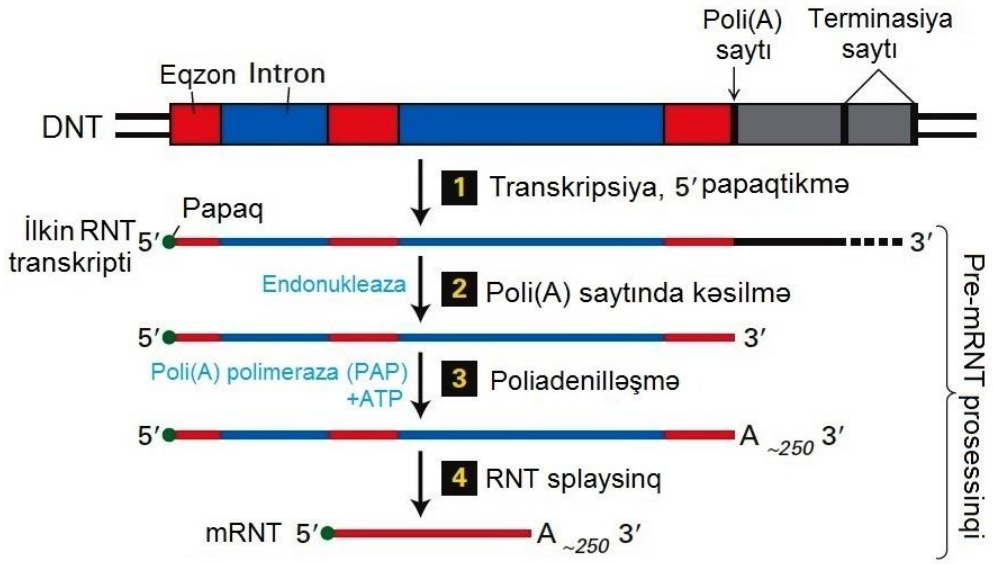
10.1 Eukariotik Pre-mRNT-nin prosessinqi

Bu bölmədə biz, eukariotik hüceyrələrin RNT polimeraza II ilə sintez olunan ilkin transkripti funksional mRNT-yə necə çevirdiyinə daha yaxından baxacağıq. Bu prosess zamanı üç əsas hadisə baş verir: *5′ papağın formalaşması*, *3′ sonluğun kəsilməsi və poliadenilləşmə*, *RNT splaysinqi* (Şəkil 10.2). Bu spesifik modifikasiyaların pre-mRNT-nin 5′ və 3′ sonluqlarına əlavə olunması onu RNT prosessinqi ilə yaranan, məsələn splays olunub çıxarılmış intronlar kimi və poliadenilləşmə saytından aşağıya doğru transkripsiya olunan RNT-lər kimi papaqsız RNT-ləri çox tez doğrayan fermentlərdən mühafizə edir. Beləliklə, 5′ papaq və 3′ poli(A) quyruq pre-mRNT molekulunu nüvədəki çoxsaylı müxtəlif tipli RNT-lərdən fərqləndirir (Cədvəl 10-1). Pre-mRNT molekulları, mRNT-ləri zitoplazmaya eksport edən nüvə zülalları ilə birləşirlər. Nüvədən eksport olunmazdan əvvəlcə, mRNT-nin düzgün kodlaşdırıcı rayonunu yaratmaq üçün intronlar uzaqlaşdırılmalıdır. Ali eukariotlarda, o cümlədən insanlarda, sintez olunan zülallara müxtəlif funksional domenləri əlavə etmək və dəyişdirmək üçün alternativ splaysing qarışıq və ciddi şəkildə tənzimlənir və bu orqanizmlərdə proteomanın xeyli genişlənməsinə səbəb olur.

Pre-mRNT-nin papaq əmələgəlmə, splaysinq və poliadenilləşmə prosessinqi hadisələri nüvədə, yeni sintez olunan RNT-nin transkripsiyasının gedişi zamanı baş verir. Beləliklə pre-mRNT-nin prosessinqi *ko-transkripsiya prosesidir*. RNT polimeraza II-nin səthindən RNT çıxdıqca, dərhal onun 5′ ucu, mRNT-lərdə tapılmış 5′ papaq quruluşun əlavə olunması ilə modifikasiya olunur (bax Şəkil 5-14). Yeni sintez olunan pre-mRNT polimerazanın səthindən çıxmaqda davam etdikcə, o dərhal RNT splaysinqinə və tam prosess olunmuş mRNT-nin nüvədən sitoplazmaya daşınmasına kömək edən RNT birləşdirən kompleks zülallar qrupunun üzvləri ilə birləşir. Bu zülallardan bəziləri mRNT ilə sitoplazmada da birləşmiş vəziyyətdə qalır, amma, əksəriyyəti nüvədə ondan ayrılır və ya mRNT sitoplazmaya eksport olunan kimi dərhal ondan ayrılaraq geriyə, nüvəyə daşınır. Sitoplazmatik RNT birləşdirən zülallar nüvə zülallarını əvəz edirlər. Nəticədə, mRNT-lər hüceyrədə heç bir zaman sərbəst RNT molekulları kimi qalmırlar və onlar həmişə, ilkin olaraq pre-mRNT-lər transkripsiya olunarkən papaq əmələgəlmə və splays olunmalarından başlayaraq **ribonukleozülal (ribonucleoprotein RNP) kompleksin** üzvləri kimi zülallarla birləşmiş vəziyyətdə olurlar. Sonra gələn, doğranma (splaysinq) və poliadenilləşmənin ardınca onlar *nüvə RNPləri* adlanan quruluşu əmələ gətirirlər. Bundan sonra, sitoplazmaya eksport edən zülallarla birləşdikdən sonra onlar *sitoplazmatik RNP-lər* adlanırlar. Hərçənd ki, biz çox hallarda onları pre-mRNT-lər və mRNT-lər hesab edirik, amma yadda saxlamaq çox vacibdir ki, onlar həmişə RNP komplekslər kimi zülallarla assosasiyada olurlar.

Cədvəl 10-1 Fəsil 10-da müzakirə olunan RNT-lər

mRNT	Tam prosess olunmuş 5′ papaqlı, RNT splaysinqlə intronları atılmış və poli (A) quyruqlu məlumat RNT-lər.
pre-mRNT	İntronlara malik olan və poli(A) saytı kəsilməyən mRNT səlәf.
hnRNT	Heterogen nüvə RNT-lər. Bunlara pre-mRNT-lər RNT prosessinqinin bir və ya daha artıq intronlara malik olan aralıq məhsulları daxildir.
snRNT	RNT splaysinqi yolu ilə pre-mRNT-lərdən intronların atılmasında fəaliyyət göstərən beş kiçik nüvə RNT-ləri və nadir intronlardan birinci ikisini əvəz edən kiçik nüvə RNT-ləri.
pre-tRNT	Yetkin tRNT ilə müqayisədə 5′ və 3′ sonluqlarında əlavə transkripsiya olunan əsaslara malik olan tRNT səlәf. Bəzi pre-tRNT-lər anti-kodon ilgəyində introna da malik olur.
pre-rRNT	Yetkin 18S, 5.8S və 28S ribosom RNT-lərin səlәfi. Yetkin rRNT-lər bu uzun səlәf RNT molekullardan prosessinqdə kəsilərək, kəsilmiş məhsulların uclarından əsasların uzaqlaşdırılması və spesifik əsasların modifikasiyası baş verir.
snoRNT	Kiçik nüvə RNT-ləri. Bunlar, pre-RNT molekulunun komplementar rayonları ilə əsas cütü əmələ gətirərək RNT zəncirinin doğranmasını və rRNT-lərin yetişməsi zamanı əsasların modifikasiyasını istiqamətləndirirlər.
siRNT	Qısa müdaxilə RNT-ləri, ~22 əsas uzunluqda olub mRNT ardıcıllığında tam komplementara malikdir. siRNT assosasiyada etdiyi zülallarla birlikdə "hədəf" RNT-nin doğranmasına səbəb olur.
miRNT	Mikro-RNT-lər, ~22 əsas uzunluqda olub, mRNT-lərlə mRNT-nin 5′ sonluğunda 2-7 əsas cütündən yuxarı, geniş surətdə əsas-cütü əmələ gətirir, amma tam yox. Bu, "hədəf" mRNT-nin translyasiaysını ingibirləşdirir.

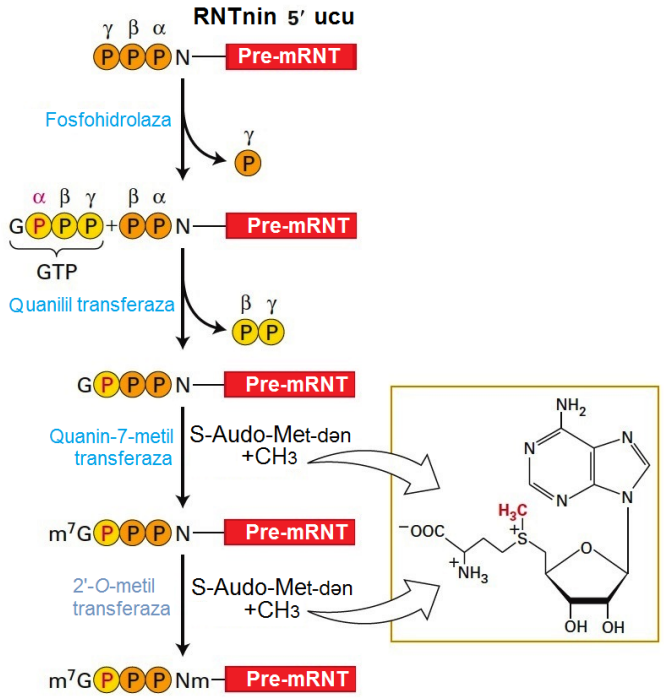


ŞƏKIL 10-2 Eukariotlarda mRNT prosessinqinə ümumi baxış. RNT polimeraza II transkripsiyanı genin birinci eqzonunun birinci nukleotidində inisiasiya etdikdən az sonra, yeni sintez olunan RNT-nin 5′ sonluğuna 7-metilquanilat papaq tikilir (pillə 1). RNT polimeraza II ilə transkripsiya, sonuncu eqzonun 3′ sonluğunda yerləşən poli(A) saytından aşağıya istiqamətdə çoxsaylı terminasiya saytlarından istənilən birində terminasiya edir. İlkin əsas transkript poli(A) saytında kəsildikdən sonra (pillə 2), adenozin (A) qalıqlarının zənciri əlavə olunur (pillə 3). Poli(a) quyruq məmәlilərdə ~250 A qalığından, həşaratlarda ~150 A qalığından, mayada isə ~100 A qalıqdan ibarətdir. Bir sıra intronlardan ibarət olan qısa ilkin transkriptlərin splaysinqi (pillə 4), göstərildiyi kimi, adətən doğranma və poliadenilləşmə ilə davam edir. Çoxsaylı intronlara malik olan böyük genlərdə intronlar tez-tez hallarda yeni sintez olunan RNT-dən transkripsiyanın gedişi müddətində, yəni, genin transkripsiyası tam başa çatmazdan əvvəl splays olunub çıxarılır. Qeyd etmək lazımdır ki, 5′ papaq və poli(A) quyruğa bitişik olan ardıcıllıq yetkin mRNT-lərdə saxlanılır. Diaqramda insanın β-qlobin RNT-sinin prosessinqi təsvir edilir.

Transkripsiyanın İnisiasiyasından Az Sonra 5′ Papaq Yeni Sintez Olunan RNT-lərə Əlavə Olunur

Yeni sintez olunan RNT transkript RNT polimeraza II-nin RNT kanalından çıxan və təxminən 25 nukleotid ardıcıllığına çatan kimi, 7-metilquanozindən və metilləşmiş ribozalardan ibarət olan qoruyucu papaq eukariotik mRNT-lərin 5′ ucuna əlavə olunur (bax Şəkil 5-14). 5′ papaq RNT-ni mRNT səlәfi kimi işarələriyir və onu nüvədə və sitoplazmada RNT-parçalayan fermentlərdən (5′-eqzoribonukleazalardan) mühafizə edir. RNT prosessinqinin ilkin mərhələsi, RNT polimeraza II-nin fosforlaşmış karboksi-terminal domeni (CTD) ilə assosasiyada

olan dimer papaqtikən fermentlə kataliz olunur. Xatırladaq ki, əsas transkripsiya faktoru TFIIH, transkripsiyanın inisiasiyası zamanı CTD-ni CTD heptapeptid təkrarların 5 serin vəziyyətində dəfələrələ fosforlaşdırır (bax Şəkil 19-20). Serin 5–fosforlaşmış CTD ilə birləşmək papaq-tikən fermentin fəallığını elə stimullaşdırır ki, o CTD-yə malik olmayan RNT polimeraza I və III-dən deyil, məhz CTD-yə malik olan RNT polimeraza II-dən çıxan 5′ trifosfata malik olan RNT-lərə yönəlir. Bu ona görə çox əhəmiyyətlidir ki, pre-mRNT sintezi, replikasiya olunan hüceyrələrdə ümumi RNT-nin 80 faizə qədərini təşkil edir. Qalan 20 faizini isə RNT polimeraza I ilə transkripsiya olunan preribosomal RNT-lər və RNT polimeraza III ilə transkripsiya olunan 5S rRNT, tRNT və digər stabil kiçik RNT-lər təşkil edirlər. Bu iki mexanizm, (1) transkripsiyanın TFIIH ilə inisiasiyası zamanı papaqtikən fermentin RNT polimeraza II ilə spesifik olaraq onun təkrarlanan hetapeptid serin 5-də fosforlaşmış unikal CTD domeni vasitəsi lə birləşməsi və (2) serin 5-də fosforlaşmış CTD-dinin papaqtikən fermenti fəallaşdırması, RNT polimeraza II ilə transkripsiya olunan RNT-lərdə spesifik papağın tikilməsi ilə nəticələnir.



ŞƏKIL 10-3 Eukariotlk mRNT-lərdə 5′ papağın sintezi. Yeni sintez olunan RNT-nin 5′ sonluğu inisiasiya etmiş NTP-nin 5′-trifosfatına malikdir. Papaq tikmənin birinci pilləsində γ-fosfat atılır, qalan α və β fosfatlar (narıncı) papaqla birləşmiş halda qalırlar. 5′, 5′-trifosfat əlaqəsinin birinci fosfatı öz quaninini donor etmiş GTP-nin α fosfatından alınır. Papaq quaninin və mRNT-nin iki ribozasından birincisinin metilləşməsi üçün metil donoru S-adenozilmetionindir (S-Ado-Met). Bax S. Venkatesan and B. Moss, 1982, *Proc.natl.acad.Sci. USA* **79**:304.

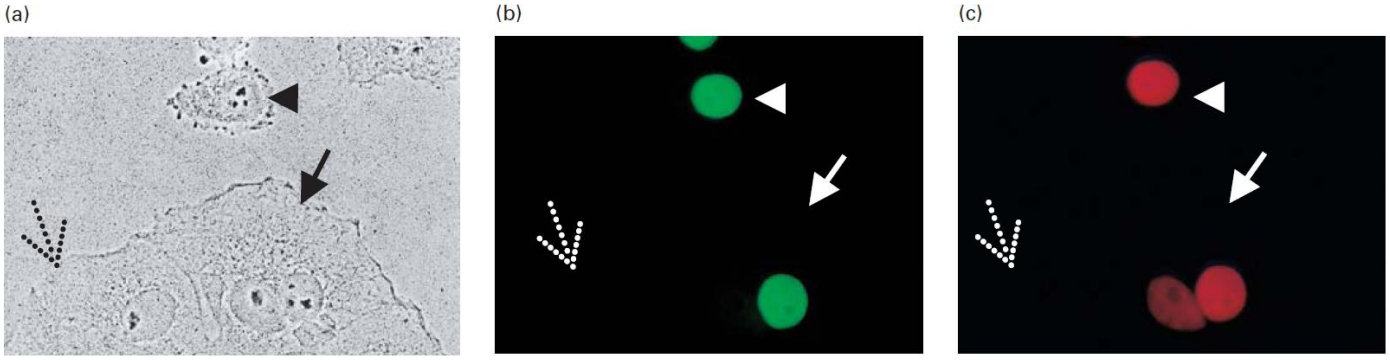
Papaqtikən fermentin bir subvahidi yeni sintez olunan RNT-nin 5′ sonluğundan γ-fosfatı ayırıb atır (Şəkil 10-3). Bu subvahidin digər domeni isə GTP-dən GMP radikalını yeni sintez olunan transkriptin 5′ sonluğuna keçirir və qeyri adi 5′-5′-trifosfat quruluşunu yaradır. Sonuncu pillələrdə, ayrı-ayrı fermentlər metal qruplarını S-adenozilmetionindən quaninin N^7-vəziyyətinə və yeni sintez olunan RNT-nin 5′ sonluğunda bir və ya iki nukleotidin ribozasının 2′ oksigenlərinə keçirir.

Kifayət qədər sübutlar göstərir ki, yeni sintez olunan transkriptlərə papağın tikilməsi RNT polimeraza II elonqasiyası ilə birləşir, belə ki, papaq onun bütün transkriptlərinə elonqasiyanın ilkin fazasında tikilir. Fəsil 9-da müzakirə olunduğu kimi, metazoanlarda transkripsiyanın başlanğıc fazasında, NELF-in (*n*egative *el*onqation *f*actor) promoter-proksimal rayonu RNT polimeraza II ilə birləşdiyindən (bax Şəkil 9-21) polimeraza yeni sintez olunan transkriptləri çox asta elonqasiya edir. Yeni sintez olunan RNT-nin 5′ sonluğuna papaq tikildikdən sonra, RNT polimeraza CTD-nin heptapeptid təkrarının serin 2 vəziyyətində və NELF və DSIF-in (*D*RB-həssaslığını *i*nduksiya edən *f*aktor) T-CDK9-tsiklin (həmçinin P-TEFb kimi məlum olan) proteinkinaza ilə fosforlaşması NELF-in buraxılmasına səbəb olur. (DRB ATP-nin analoqudur, CDK9-u ingibirləşdirir və promoter-proksimal rayondan transkripsiyanın elonqasiyasına mane olur.) Bu RNT polimeraza II ilə elonqasiyanın sürətli elonqasiya rejiminə keçməsinə və tez bir şəkildə transkripsiya edib promotordan uzaqlaşmasına imkan verir. Bu mexanizmin xalis təsiri ondan ibarətdir ki, polimeraza sürətli elonqasiyaya başlamazdan əvvəl yeni sintez olunan RNT-yə elonqasiyadan-öncə papaq tikilməsini gözləyir.

Konservativ RNT-Birləşdirən Domenə Malik Olan Müxtəlif Zülallar Dəsti Pre-mRNT-lərlə Birləşir

Əvəllər qeyd olunduğu kimi, birlikdə pre-mRNT-lər hesab olunan, nə zülal kodlaşdıran genlərin yeni sintez olunan RNT transkriptləri, nə də RNT prosessinqinin aralıq məhsulları eukariotik hüceyrələrin nüvəsində sərbəst RNT molekulları kimi mövcud olmurlar. Yeni sintez olunan transkript RNT polimeraza II-dən çıxdığı andan yetkin mRNT-lərin sitoplazmaya daşınmasına qədər RNT molekulları çoxsaylı zəngin nüvə zülalları ilə assosasiyada olurlar. Bu zülallar *heterogen ribonukleaprotein zərrəciklərin* (*hnRNP-lər*) *heterogen nüvə RNT-lərinə* (*hnRNT*) malik olan əsas zülal komponentləridirlər və bu termin pre-mRNT-yə və müxtəlif ölçülü başqa nüvə RNT-lərinə birlikdə aid edilir. Bu hnRNP zülalları RNT prosessinqinin sonrakı mərhələlərinə, o cümlədən splaysinqə, poliadenilləşməyə və nüvə məsamələri kompleksindən keçərək sitoplazmaya daşınmasına kömək edirlər.

Tədqiqatçılar hnRNP zülalları ilk dəfə kultura olunan hüceyrələri yüksək dozalı UV şüalandırmaya məruz qoymaqla aşkar etdilər, bu şüalanma RNT əsasları ilə onlara sıx bağlı olan zülallar arasında kovalemt çarpaz əlaqələrin yaranmasına səbəb oldu. Təsir edilmiş hüceyrələrin nüvə ekstraktlarının, poli(A) quyruqlu RNT-lər tikilmiş oliqo-dT sellüloza kolonkalarında aparılan xromotoqrafiya poliadenilləşmiş nüvə RNT-si ilə kəsişən zülalları aşkar etmək üçün istifadə edildi. Şüalandırılmamış hüceyrələrdən alınan ekstraktların sonra, çarpaz-tikilmə metodu ilə identifikasiya olunan, əsas zülallara spesifik olan monoklonal anticismlərlə təsir edilmələri zəngin hnRNP zülalların ölçüsü 30-dan 120 kDa qədər olan kompleks dəstini aşkar etdi.



ŞƏKİL 10-4 İnsanın hnRNP A1 zülalı nüvəyə daxil olmaqla və çıxmaqla dövrə edə bilir, amma insanın hnRNP C zülalı edə bilmir. Kultura olunmuş HeLa hüceyrələri və *Xenopus* hüceyrələri polietilenqlikolla təsir etməklə qovuşaraq hər iki hüceyrə tipinin nüvəsinə malik olan heterokaryonu əmələ gətirirlər. Hibrid hüceyrələrdə zülal sintezinə mane olmaq üçün, qovuşduqdan dərhal sonra tsikloheksimidlə təsir edildi. 2 saatdan sonra, hüceyrələr fiksasiya olunaraq, insanın hnRNP C və A1 zülallarına spesifik olan fluoressent nişanlanmış anticismlərlə rəngləndi. Bu anticismlər homoloji *Xenopus* zülallarına birləşmirlər. (a) Faza-kontrast mikroskopiyası ilə vizuallaşdırılmış fiksasiya olunmuş preparata qovuşmayan HeLa hüceyrələri (ox ücları) və *Xenopus* hüceyrələri (nöqtəli oxlar) və eləcə də qovuşan heterokaryon (bütöv ox) daxildirlər. Bu mikrofotoda heterokaryonda dairəvi HeLa hüceyrəsi nüvələri oval-formalı *Xenopus* nüvəsindən sağda yerləşir. (b, c) Eyni preparata fluoressent mikroskopiya ilə baxılarkən, rənglənmiş hnRNP C zülalı yaşıl rəngdə, rənglənmiş hnRNP A1 zülalı isə qırmızı rəngdə görünürlər. Qeyd edək ki, qovuşmayan *Xenopus* hüceyrələri sol tərəfdə rənglənməmişdir, bu təsdiq edir ki, anticismlər insan zülalları üçün spesifikdir. Heterokaryonlarda, hnRNP C zülalı yalnız HeLa-hüceyrə nüvələrində (b) və *Xenopus* nüvələrində (c) meydana çıxır. Hüceyrə qovuşmasından sonra zülal sintezi blok olunduğundan insan hnRNP A1 zülallarının bəziləri heterokaryonda HeLa-hüceyrə nüvələrini tərk etmiş, sitoplazmadan keçərək *Xenopus* nüvələrinə daxil olmuşlar. [Nature Publishing Group razılığı ilə Piñol-Roma S., and Dreyfuss, G., "Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm," *Nature,* 1992, **355**(6362):730–2 –dən yenidən çapp olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Incş vasitəsi ilə alınmışdır.]

Transkripsiya faktorları kimi, hnRNP zülalların əksəriyyəti modulyar quruluşa malikdirlər. Onlar bir və ya daha artıq *RNT-birləşdirən domenlərə* və başqa zülallarla əlaqə yaradan ən azı başqa bir domenə də malikdirlər. Bir sıra müxtəlif RNT-birləşdirən motiflər, bəzi aminturşu ardıcıllıqları itirilmiş hnRNP zülallarını yaratmaqla və onların RNT birləşdirmək qabiliyyətini sınaqdan keçirməklə müəyyən edilmişdir.

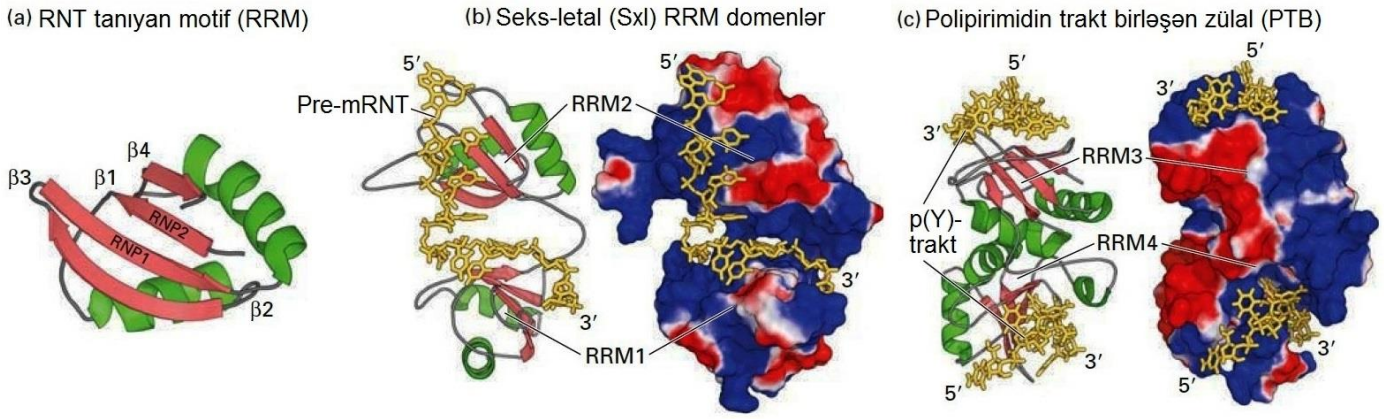
hnRNP Zülalların Funksiyası Pre-mRNT-lərin hnRNP zülallarla birləşməsi pre-mRNT-yə, komplementar rayonlar arasında əsas cütü yaratmaqla qısa ikinci quruluşları əmələ gətirməsinə mane olur, beləliklə də, pre-mRNT-ni başqa RNT molekullarına və zülallara qarşılıqlı əlaqə yaratmaq üçün əlçatan edir. HnRNP zülallarla assosasiya edən pre-mRNT-lər, sonrakı prosessinq mərhələləri üçün, hər biri spesifik ardıcıllığına əsasən unikal ikinci quruluşu əmələ gətirən birləşməmiş sərbəst pre-mRNT-lər olmaqdan daha çox yekcins substratı təmsil edirlər.

Təmizlənmiş hnRNP zülallarla aparılan birləşmə tədqiqatları göstərir ki, müxtəlif hnRNP zülallar yeni sintez olunmuş pre-mRNT molekulunun fərqli rayonları ilə birləşirlər. Məsələn, A1, C və D hnRNP zülallar daha böyük üstünlüklə intronların 3′ sonluğunda pirimidinlə zəngin olan ardıcıllıqlarda birləşirlər (bax Şəkil 10-7). Bəzi hnRNP zülallar RNT splaysinqini müəyyən edən RNT ardıcıllıqları ilə və ya kəsilmə/poliadenilləşmə ardıcıllıqları ilə qarşılıqlı təsirə girirlər və RNT-prosessinqi faktorları tərəfindən tanınırlar. Nəhayət, hüceyrə-qovşaq eksperimentləri göstərdi ki, bəzi hnRNP zülallar nüvədə yerləşmiş vəziyyətdə qalırlar, halbuki digərləri sitoplazmaya keçib qayıtmaqla dövrə edirlər, bu da göstərir ki, onlar mRNT-nin daşınmasında iştirak edirlər (Şəkil 10-4).

Konservativ RNT-Birləşdirən Motiflər RNP motif və RNT birləşən domen (RBD) kimi də adlandırılan *RNT tanıyan motif* (*RRM*) hnRNP zülallarda ən geniş yayılmış RNT-birləşən domendir. Çoxsaylı digər RNT birləşən zülallarda rast gəlinən, 80 qalıqdan ibarət olan bu domen iki yüksək konservativ ardıcıllığa malikdir (RNP1 və RNP2) və bunlar mayadan insana qədər geniş çeşiddə orqanizmlərdə tapılmışdır, bu da onların eukariotların təkamülünün erkən dövründə yarandığını göstərir.

Quruluş analizləri göstərdi ki, RRM domen, bir cinahında iki α spiral yerləşən dörd-sarınmış β vərəqlərdən təşkil olunmuşdur. Mənfi yüklənmiş RNT fosfatları ilə əlaqə yaratmaq üçün β vərəq müsbət yüklənmiş səthi yaradır. Konservativ RNP1 və RNP2 ardıcıllıqlar iki mərkəzi β zəncirlərlə yan-yana yerləşirlər və onların yan zəncirləri β vərəqlərin səthi üzərində çarpaz yerləşmiş RNT-nin tək-zəncirli rayonu ilə çoxsaylı əlaqələr yaradırlar (Şəkil 10-5).

45 qalıqdan ibarət olan ***KH motif*** hnRNP K zülalında və bir sıra başqa RNT birləşən zülallarda tapılmışdır. KH domenlərin nümayəndəsinin üç-ölçülü quruluşu RRM domenin üçölçülü quruluşuna bənzəyir, amma kiçik olub üç sarınmış β vərəqdən ibarətdir və bir tərəfindən iki α spiralla dayaq olunur. Bununla belə, KH domeni RRM domendən çox fərqli bir yolla RNT ilə qarşılıqlı əlaqə yaradır. RNT KH domenə onun α spiralı və bir β zənciri vasitəsilə formalaşmış hidrofob səthi ilə qarşılıqlı əlaqə yaratmaqla birləşir. hnRNP zülallarında tapılmış başqa RNT-birləşdirən motif *RGG boks*, aralarında bir neçə aromatik amin turşuları səpilmiş beş Arg-Gly-Gly (RGG) təkrarına malikdir. Son zamanların quruluş analizləri göstərir ki, RNT birləşməsinin bir nümunəsi, RGG-yə-malik olan peptid DNT-nin dupleks rayonunun G-zəngin böyük şırımına birləşir (bax Şəkil 5-4b). KH domenlər və RGG təkrarlar tez-tez hallarda tək RNT-birləşən zülalda iki və daha artıq dəstlər şəkilində növbələşirlər.



ŞƏKİL 10-5 RRM domenin quruluşu və onun RNT ilə əlaqəsi. (a) RRM domenin diaqramı, bu motivi səciyyələndirən iki α spiralı (yaşıl) və dörd β zənciri (qırmızı) göstərir. Konservativ RNP1 və RNP2 rayonlar iki mərkəzi β zəncirlərdə yerləşir. (b, c) *Drosophila* Seks-letal (Sxl) zülalın (b) və polipirimidin trakt-birləşən zülalın (PTB) iki RRM domenlərinin lent diaqramı və səth təsviri. (b) və (c) hər ikisində müsbət yüklənmiş rayonlar mavi kölgə ilə göstərilmişdir, mənfi yüklənmiş rayonlar qırmızı kölgə ilə göstərilir, RNT isə sarıdır. Sxl-də iki RRM açılmış kastanet cütlərin iki hissəsi kimi, RRM-lərin β vərəqləri bir-birinə baxan istiqamətdə yönəlmişdir. Pre-mRNT-lər β vərəqlərin müsbət yüklənmiş səthlərinə birləşmişdir, hər bir RRM-nin RNP1 və RNP2 rayonları ilə kontaktlarının əksər hissəsini təşkil edir. PTB, RRM domainlərinin çox fərqli istiqamətlərinə malikdir, bu göstərir ki, müxtəlif hnRNP-lərdə RRM-lər müxtəlif nisbi vəziyyətlərdə yerləşirlər. P(Y)-trakt polipirimidin traktdır. PTB-də iki RRM öz α spiralları ilə elə assosasiya edirlər ki, müsbət yüklənmiş β vərəqlər, RRM3 üçün yuxarıya doğru, RRM4 üçün isə aşağıya oğru olmaqla bir-birindən kənara yönəlmişlər. Bu iki RRM-lərin hər biri ilə birləşmiş CUCUCU bir-zəncirli RNT-nin quruluşu təyin edilmişdir, bu PTB-nin tək bir RNT-də altı pirimidinin bir-birindən 15 və ya daha artıq nukleotid ilgəklə ayrıldığı iki trakta necə birləşdiyini izah edir. PTB-nin pre-mRNT-də kiçik ilgək əmələ gətirən bu qabliyyəti onun yuxarıya istiqamətdə 3′ splays saytında və ya aşağıya istiqamətdə 5′ splays saytında iki polipirimidin traktla cinah olan eqzonlarda splaysinq repressoru kimi fəaliyyət göstərmək qabiliyyətinə kömək edir. Bax K. Nagai et al., 1995, *Trends Biochem. Sci.* **20**:235. [(b) hissəsi verilənlər N. Harada et al., 1999, *Nature* **398**:579, PDB ID 1b7f-dən. (c) hissəsi verilənlər F. C. Oberstrass et al., 2006, *Science* **309**:2054, PDB ID 2adb, 2adc-dən.]

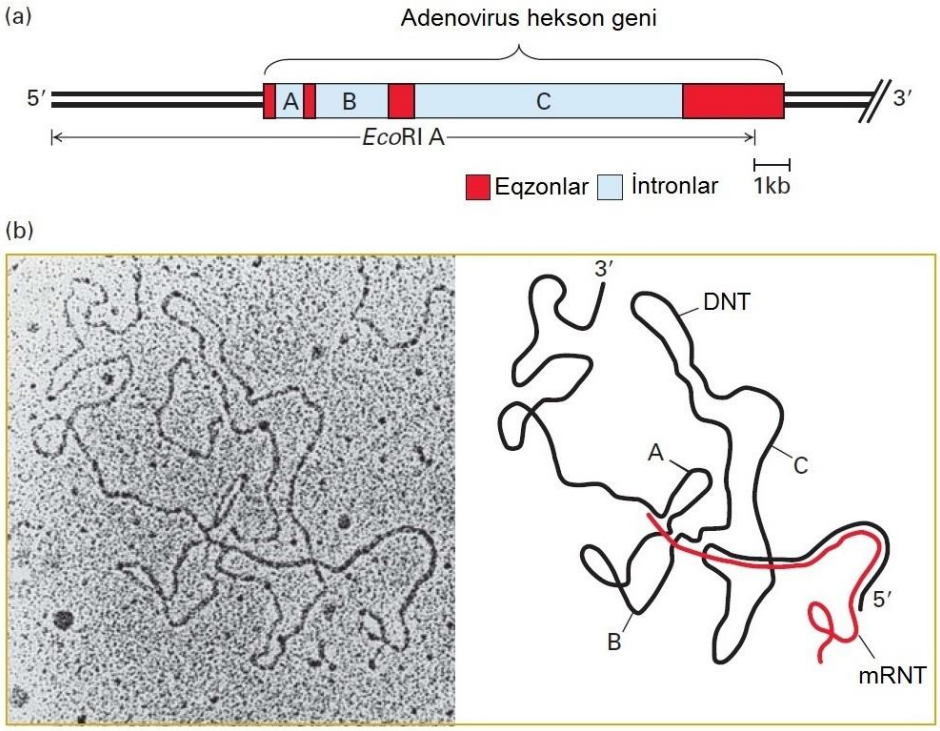
Splaysinq İki Transefirləşmə Reaksiyaları ilə Pre-mRNT-lərin Qısa Konservativ Ardıcıllıqlarında Baş Verir

Yetişmiş funksional mRNT-nin formalaşması zamanı **intronlar** atılır, eqzonlar isə bir yerə splays olunurlar. Qısa transkripsiya vahidləri üçün, **RNT splaysinq** adətən, Şəkil 10-2-də insanın β-qlobin mRNT-nin prosessinqində göstərildiyi kimi, ilkin transkriptin 3′ sonluğunda kəsilmənin və poliadenilləşmənin ardınca gəlir. Amma, çoxsaylı eqzonlara malik olan uzun transkripsiya vahidlərində yeni sintez olunan RNT-də eqzonların splaysinqi genin transkripsiyası tamamlanmamış başlanır.

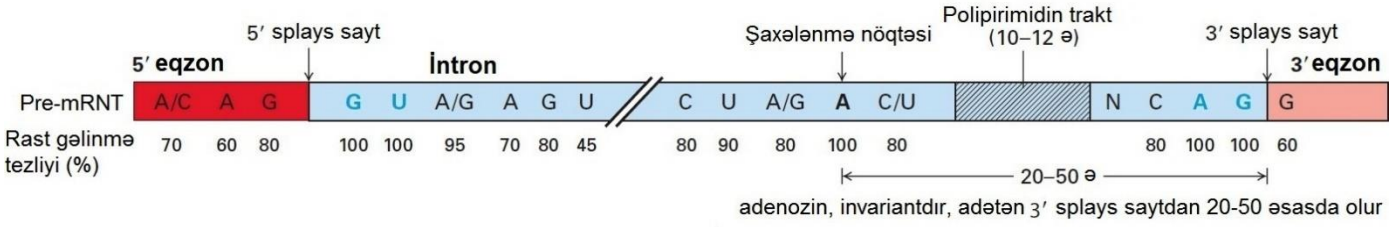
mRNT-lərin nüvə prosessinqi üzrə ilk pioner tədqiqatlar aşkar etdi ki, mRNT-lər ilkin olaraq sitoplazmadakı yetkin mRNT-lərə nisbətən əsasən çox uzun RNT-lər şəkilində transkripsiya olunurlar. Həmçinin göstərilmişdir ki, transkripsiyanın inisasiyasından dərhal sonra əlavə olunan 5′ papağa yaxın olan RNT ardıcıllıqları yetkin RNT-də saxlanılır və mRNT prosessinqinin aralıq məhsullarında olan poliadenilləşmiş sonluğa yaxın RNT ardıcıllıqları da sitoplazmadakı yetkin mRNT-də saxlanılır. Belə bir aydın görünən məsələnin həlli, adenovirus DNT-si ilə əsas virion kapsid zülalı heksonu kodlaşdıran mRNT-nin RNT-DNT hibridlərin intronlarının elektron mikroskopu ilə aşkar olunmasından alınmışdır (Şəkil 10-6). Başqa tədqiqatlar, virus DNT-si ilə (ilkin əsas transkriptlər) birgə-xətti (colinear) olan nüvə virus RNT-lərini və digərləri bir və ya iki intronu atılmış RNT-ləri (prosessinqin aralıq məhsulu) aşkar etdi. Bu nəticələr birlikdə, belə bir fikirin yaranmasına gətirib çıxardı ki, eqzonlar bir yerə splays olunarkən intronlar ilkin transkriptdən atılır.

Eqzon-intron qovşaqları olan *splays saytları* pre-mRNT-də yerləşməsi genom DNT-si ardıcıllığının uyğun mRNT-dən hazırlanmış kDNT ardıcıllığı ilə müqayisəsindən təyin edilə bilər (bax Şəkil 6-17). Genom DNT-sində olan, amma kDNT-də çatışmayan ardıcıllıqlar intronları təmsil edir və splays saytların yerlərini göstərir. Böyük sayda müxtəlif mRNT-lərin belə analizi, eukariot pre-mRNT-lərdə intronlara cinah olan splays saytlarında, 3′ splays saytından yuxarıya istiqamətdə yerləşən poliprimidin traktı da daxil olmaqla orta konservativ qısa konsensus ardıcıllıqları aşkar etdi (Şəkil 10-7). İntronlarında silinmələrlə aparılan mutant genlərin tədqiqatı göstərdi ki, intronların mərkəzi hissəsinin çoxu splaysinqə təsir etmədən atıla bilər, əsasən intronun hər bir ucundakı yalnız 30-40 nukleotid splaysinqin normal sürətlə baş verməsi üçün lazımdır.

Pre-mRNT-nin in vitro splaysinqi zamanı əmələ gələn aralıq məhsulların analizi, eqzonların splaysinqinin iki ardıcıl *transefirləşmə reaksiyaları* ilə getdiyini aşkar etdi (Şəkil 10-8). İntronlar, intronun 5′ quanin qalığının qeyri-adi 2′, 5′-fosfodiefir əlaqələri ilə intronun 3′ sonluğuna yaxın olan adenozinə birləşdiyi lariat quruluş şəkilində uzaqlaşdırılır. Bu A qalığı lariat quruluşda RNT şaxəsini yaratdığından *şaxələnmə nöqtəsi* A adlandırılır. Hər bir transefirləşmə reaksiyasında bir fosfodiefir əlaqəsi başqasına dəyişilir. Molekulda fosfodiefir əlaqələrinin sayı hər iki reaksiyada dəyişilmədiyindən, enerji sərf olunmur. Bu iki reaksiyanın xalis nəticəsi odur ki, iki eqzon liqasiya olunur və müdaxilə edən (aralıq) intron isə şaxələnmiş lariat quruluş kimi buraxılır.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 10-6
mRNT-templeyt DNT hibridlərin elektron mikroskopiyası göstərir ki, intronlar pre-mRNT-nin prosessinqi zamanı splays olunaraq çıxırlar. (a) Adenovirus DNT-nin genomu sol ucundan hekson genin sonuncu eqzonunun axırına qədər uzanan *Eco*RI A fraqmentinin diaqramı. Hekson geni, bir-birindən ~1, 2.5 və 9 kə ölçülü üç intronla ayrılmış üç qısa eqzondan və bir uzun (~3.5 kə) eqzondan ibarətdir. (b) *Eco*RI A DNT fraqmenti ilə hekson mRNT arasındakı hibridin elektron mikrofotosu (*solda*) və sxematik çəkilmiş şəkili (*sağda*). A, B və C ilə işarələnmiş ilgəklər (a)-da göstərilmiş intronlara uyğundur. Virus genom DNT-sində bu intron ardıcıllıqlar yetişmiş hekson mRNT-də mövcud olunmadığından, onlar, mRNT-də özlərinin komplementar ardıcıllıqları ilə hibridləşən eqzon ardıcıllıqları arasından ilgək əmələ gətirərək ayrılıb çıxırlar. [Mikrofoto nəzakətlə Phillip A. Sharp tərəfindən.]



ŞƏKİL 10-7 Onurğalıların pre-mRNT-lərində splays saytları ətrafında konsensus ardıcıllıqlar. Yalnız invariant (dəyişməz) əsaslar demək olar ki, intronların 5′ GU və 3′ AG əsaslarıdır (mavi), hərçənd ki, qeyd olunan cinah əsaslar, təsadüfi paylanmaya əsasən gözlənilən əsaslardan daha yüksək tezlikdə tapılır. İntronun 3′ sonluğu yaxınlığında pirimidinlə-zəngin rayon (ştrixlənmiş sahə) demək olar ki, intronlarıln əksəriyyətində tapılmışdır. Şaxələnmə-nöqtəsi adenozin də invariantdır, adətən 3′ splays saytından 25-50 əsas məsafədə olur. İntronun, 40 əsasdan 50 kiloəsasa qədər uzunluqda ola bilən mərkəzi rayonu splaysinqin baş verməsi üçün vacib deyildir. Bax R.A. Padgett et al., 1986, *Ann.Rev.Biochem*. **55**:1119 və E.B. Keller and W.A. Noon, 1984, *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* **81**:7417.

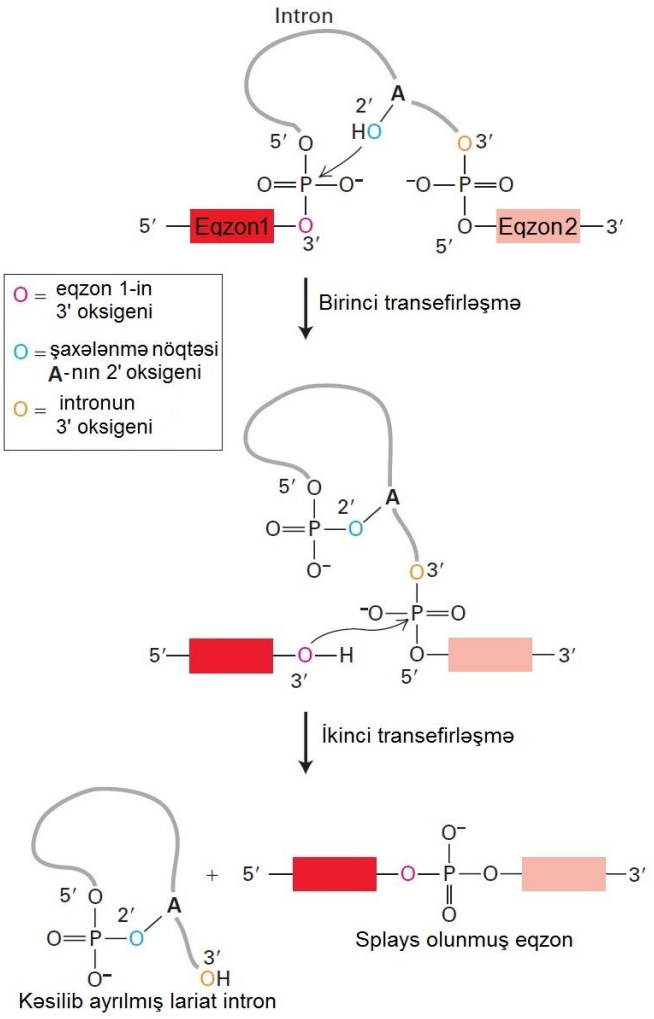
Splaysinq zamanı snRNT-lər pre-mRNT ilə Əsas cütü Əmələ Gətirirlər

Splaysinq, pre-mRNT ilə əsas cütü əmələ gətirən **kiçik nüvə RNT-lərinin (snRNT-lər)** və assosasiyada olan 170-ə qədər zülalların iştirakını tələb edir. U1, U2, U4, U5 və U6 adlandırılan U-ilə zəngin beş snRNT-lər pre-mRNT-nin splaysinqində iştirak edirlər. Uzunluğu 107-210 nukleotidə qədər olan bu snRNT-lərin hər biri eukariot hüceyrələrin nüvəsində çoxsaylı *kiçik nüvə ribonukleozülal zərrəciklərində* 6-10 zülalla birləşirlər.

U1 snRNT-nin splaysinqdə rolunun qəti sübutu, pre-mRNT-nin 5′ splays saytı ilə U1 snRNT-nin 5′ rayonu arasında əsas cütünün əmələ gəlməsinin RNT splaysinqi üçün tələb olunduğunu göstərən eksperimentlərdən meydana gəlmişdir (Şəkil 10-9). İn vitro eksperimentlər göstərdi ki, U1 snRNT-nin 5′-sonluq rayonu ilə hibridləşən sintetik oliqonukleotid RNT splaysinqini blok edir. İn vivo eksperimentlər göstərdi ki, pre-mRNT-nin 5′ splays saytında əsas-cütü-əməlegəlməni-qıran mutasiyalar da RNT splaysinqini blok edir, amma bu halda splaysinq mutant U1 snRNT-nin, mutant pre-mRNT-nin 5′ splays saytında əsas cütünün əmələ gəlməsini bərpa edən kompensasiya mutasiyası ilə ekspressiya olunmasıyla bərpa oluna bilər (Şəkil 10-9b). U2 snRNT-nin splaysinqdə iştirak etməsi ilk dəfə o zaman guman olunmuşdur ki, o, pre-mRNT-də şaxələnmə nöqtəsinə cinah olan, konsensus ardıcıllığa komplementar olan daxili ardıcıllığa malikdir (bax Şəkil 10-7). U1 snRNT və 5′ splays saytı üçün istifadə olunan eksperimentlər kimi, kompensasiya mutasiyası eksperimentləıri göstərdi ki, U2 snRNT ilə pre-mRNT-də şaxə-nöqtəsi ardıcıllığı arasında əsas cütün əmələ gəlməsi splaysinq üçün kritik əhəmiyyətə malikdir.

Şəkil 10-9a U1 və U2 snRNT-lərin əsas quruluşlarını və onların splaysinq zamanı pre-mRMNT ilə necə əsas cütü əmələ gətirdiklərini göstərir. Əhəmiyyətlidir ki, U2 snRNT ilə əsas cütü yaratmayan şaxələnmə-nöqtəsi A özlüyündə "qabağa çıxır" (Şəkil 10-10a) və onun 2′ hidroksilinin RNT splaysinqinin birinci transefirləşmə reaksiyasında iştirak etməsinə imkan verir (bax Şəkil 10-8).

Digər snRNT-lərlə aparılan oxşar tədqiqatlar göstərdi ki, splaysinq zamanı snRNT-lərin öz aralarında da əsas cütünün yaranması baş verir. Bundan başqa, belə RNT-RNT qarşılıqlı əlaqələrinin yenidən qurulması splaysinq yolu üçün çox əhəmiyyətlidir.



ŞƏKİL 10-8 İki transefirləşmə reaksiyası pre-mRNT-də eqzonların splaysinqi ilə nəticələnir. Birinci reaksiyada, intronun 5′ fosfatı ilə 1-ci eqzonun 3′ oksigeni (tünd qırmızı) arasında efir əlaqəsi şaxələnmə-saytı A qalığının 2′ oksigeni ilə birləşmiş efir əlaqəsi ilə dəyişilir. İkinci reaksiyada, 2-ci eqzonun 5′ fosforu ilə intronun 3′ oksigeni (narıncı) arasındakı efir əlaqəsi 1-ci eqzonun 3′ oksigeninə olan efir əlaqəsi ilə dəyişilir, nəticədə intron lariat quruluş kimi buraxılır və iki eqzon birləşir. Oxlar fəallaşmış hidroksil oksigeninin fosfor atomları ilə reaksiya girdiyini göstərir.

Yuxarıda qeyd edildiyi kimi, U1 snRNT-nin 5′ ucu ilə əsas cütü əmələ gətirən sintetik oliqonukleotidin in vitro RNT slaysinqini ingibirləşdirdiyinin aşkar edilməsi pre-mRNT splaysinqinin birinci pilləsində U1 snRNT-nin 5′ splays saytı ilə əsas cütü əmələ gətirməsinin əhəmiyyətini dəstəkləyir. Hal hazırda, oxşar strateqiya Duşenne əzələ distrofiyasının (DMD) müalicəsində kliniki tədiqatlar kimi istifadə edilir. Bu pozuntu genomda olan yeni mutasiyalara görə insanın çox rast gəlinən genetik xəstəliklərindəndir. O, *DMD* genində olan mutasiyalar nəticəsində, xüsusən də, eqzonda stop kodonu əmələ gətirən əsas cütlərinin dəyişməsi ilə yaranan zənciri terminasiya edən mutasiyalar nəticəsində baş verir. Alternativ olaraq, oxunan çərçivəni dəyişən qısa silinmələr (delesiyalar) və ya daxiledilmələr (insersiyalar) anormal amin turşularının translyasiyasına səbəb olur, adətən ardınca da dəyişilmiş oxunan çərçivədə stop kodon gəlir. Bu mutasiyalar kodlaşdırılan zülalın, distrofinin onun çox zəruri olan C-sonluğunun itirilməsinə səbəb olur (bax Şəkil 17-20, *aşağıda*). *DMD* geni insanın ən uzun genidir (~2 million əsas cütü uzunluqdadır, bütöv *E. coli* genomunun yarısı qədərdir), bu onu təsadüfi mutasiyaların böyük hədəfi edir. DMD geni X xromosomunda olduğundan, onun erkəklərdə mutasiyanın komplementarı olan ikinci təbii formalı nüsxəsi olmur. Hüceyrə membranından nüfuz edib keçmək üçün modifikasiya olunmuş, amma normal Uotson-Krik əsas cütü əmələ gətirmək qabiliyyətli sintetik oliqonukleotidlər yaradılıb inkişaf etdirilmişdir. Mutant eqzonun sonluğu ilə hibridləşdirməklə onlar splaysinq zamanı anormal eqzonun mRNT-dən öncə "buraxılmasına" səbəb ola bilirlər və elə dizayn oluna bilir ki, mutasiyadan yuxarıya istiqamətdə olan normal eqzon mutasiyadan aşağıya istiqamətdə eqzonla çərçivədə normal splays olunsun. Bu daxilində silinmə olan, amma potensial olaraq əks halda dağıdıcı olan simptomların qarşısını almaq üçün kifayət qədər funksiyaya malik olan zülalın ekspressiyasına səbəb olur.

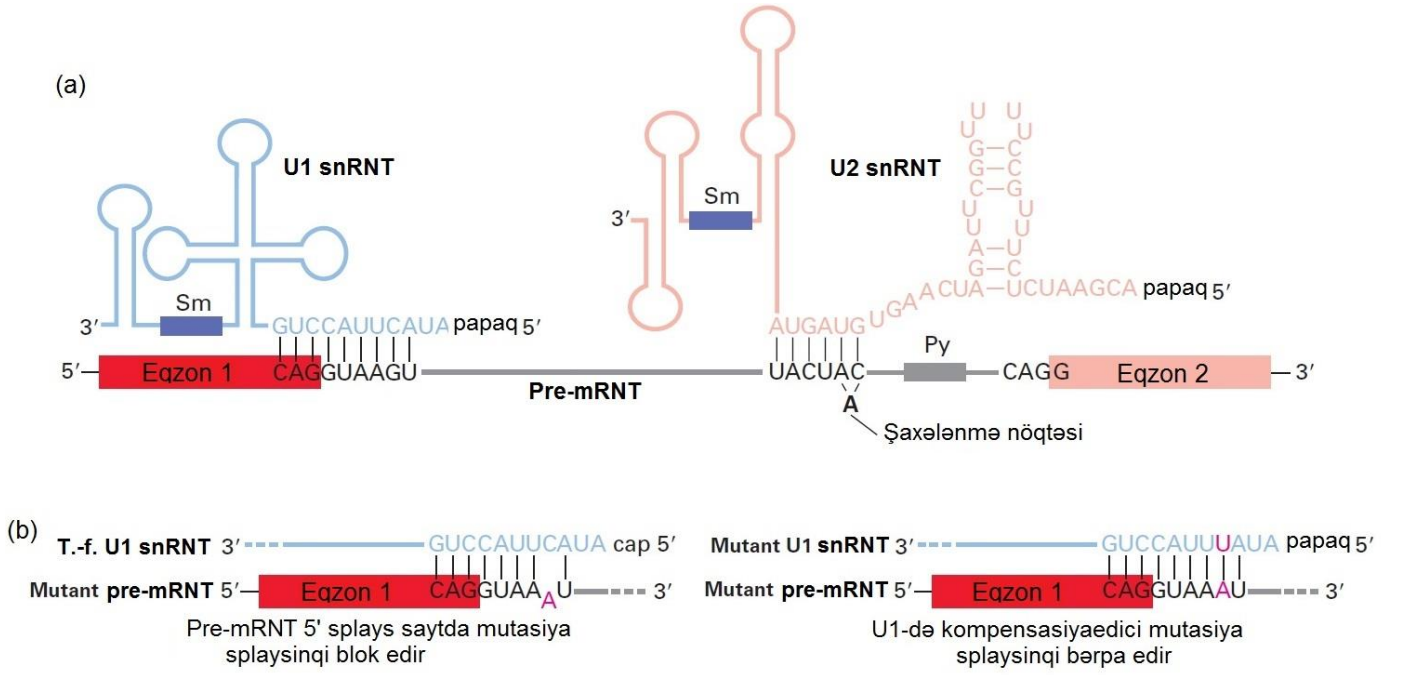
snRNP-lərdən və Pre-mRNT-dən Toplanmış Splaysesomlar Splaysinqi Aparırlar

Beş splaysinq snRNT-lər və splaysinqdə iştirak edın başqa zülallar pre-mRNT üzərində toplanaraq **splaysesomlar** adlanan böyük ribonukleozülal kompleksini yaradırlar (Şəkil 10-11). Splaysesomlar ribosomlara yaxın olan kütləyə malikdirlər. Splaysesomun toplanması U1 snRNT-nin 5′ splays saytla əsas cütü əmələ gətirməsi ilə, həmçinin SF1 (splaysinq faktor 1) zülalın şaxələnmə nöqtəsi A ilə, U2AF (U2 assosasiya-edən-faktor) heterodimer zülalın pirimidin traktı ilə və intronun 3′ AG qalıqlarına uyğun olaraq onun böyük və kiçik subvahidləri vasitəsi ilə kooperativ birləşməsilə başlanır. Sonra, SF1 buraxılan kimi U2 snRNP şaxələnmə nöqtəsi rayonu ilə əsas cütü əmələ gətirir (bax Şəkil 10-9a). U4 və U6 snRNP-lərdə snRNT-lər arasında geniş şəkildə əsas cütlərinin əmələ gəlməsi U5 snRNP ilə birləşən kompleksi formalaşdırır. Sonra bu U4/U6/U5 "üç-snRNP" əvvəldə yaranmış U1/U2/pre-mRNT kompleksi ilə birləşərək splaysesomları yaradırlar.

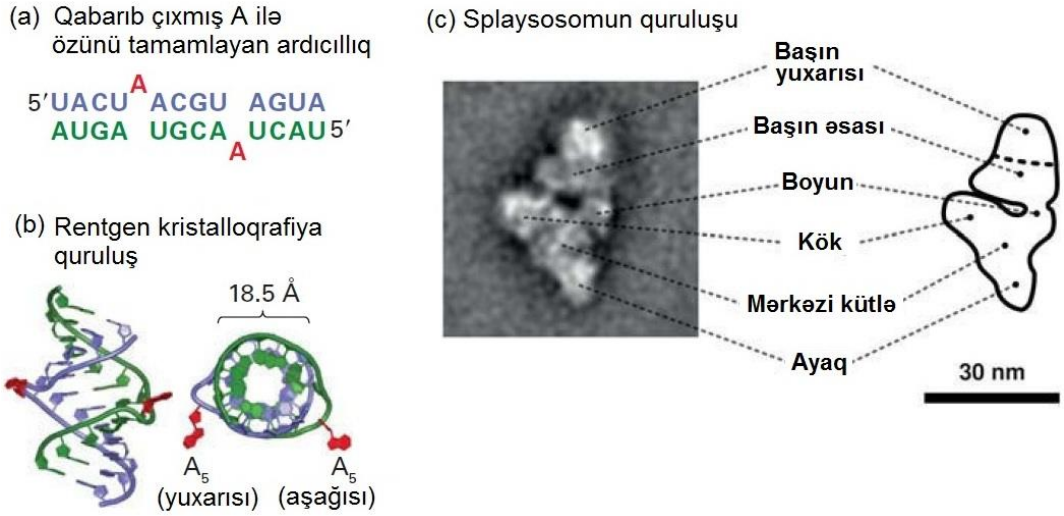
Splaysesom formalaşdıqdan sonra, snRNT-lərin və pre-mRNT-lərin əsas cütlərinin geniş şəkildə yenidən düzülməsi U1 snRNP-nin buraxılmasına səbəb olur. Şəkil 10-10c, splaysinq

prosesindəki bu aralıq məhsulun krioelektron mikroskopu ilə çəkilmiş quruluşunu göstərir. Splaysesom komponentlərinin daha sonra yenidənqurulması U4 snRNP-nin itirilməsi ilə baş verir. Onun buraxılması, şaxələnmə nöqtəsi A üzərindəki 2′ hidroksil ilə intronun 5′ ucundakı fosfat arasında 2′,5′-fosfodiefir əlaqəsini formalaşdıran birinci transefirləşmə reaksiyasını kataliz edən kompleksi yaradır (Şəkil 10-8). snRNP-lərin başqa bir yenidən-qurulmasının ardınca, ikinci transefirləşmə reaksiyası iki eqzonu 3′,5′-fosfodiefir əlaqəli zəncirdə liqasiya edir və intronu snRNP-lərlə birləşmiş şəkildə lariat quruluşda buraxır. Bu sonuncu (final) intron-snRNP kompleksi tez bir şəkildə dissosasiya edir və azad olmuş fərdi snRNP-lər yeni spalysinq tsiklində iştirak edə bilirlər. Kəsilmiş intronlar sonra tez bir şəkildə şaxələnməni dağıdan fermentlə və sonra müzakirə edəcəyimiz başqa nüvə RN-azaları ilə parçalanır.

Yuxarıda göstərildiyi kimi, splaysesomlar təxminən ribosomların ölçüsündə olur və 170-ə qədər zülaldan təşkil olunur, bunlardan beş snRNP-lərlə birləşmiş zülallardan əlavə, təxminən 100-ü "splaysinq faktorları"dırlar. Mürəkkəbliyinə görə, bu RNT splaysinqini transkripsiya və zülal sintezi ilə müqayisə oluna bilən edir. Bəzi splaysinq faktorları snRNP-lərlə assosasiya edir, amma, digərləri etmir. Məsələn, U2-ilə assosasiya edən faktorun (U2AF) 65 kDa subvahidi intronun 3′ sonluğu yaxınlığında polipirimidin trakta və U2 snRNP-yə birləşir. U2AF-in 35 kDa subvahidi intronun 3′ sonluğunda AG dinukleotidə birləşir və U2AF-in yaxınlıqda birləşmiş böyük subvahidi ilə qarşılıqlı əlaqəyə girir. U2AF-in bu iki subvahidi, U2 snRNP-nin şaxələnmə nöqtəsi ilə qarşılıqlı təsirini gücləndirməklə 3′ splays saytını dəqiqləşdirməyə kömək etmək üçün SF1 ilə birlikdə fəaliyyət göstərir (bax Şəkil 10-11 pillə 1). Bəzi splaysinq faktorları da, məlum RNT helikazalara ardıcıllıq homologiyası nümayiş etdirirlər, bu faktorlar yəqin ki, splaysosomal splaysinq tsikli zamanı snRNT-lər arasında baş verən əsas cütlərinin yenidən düzülməsi üçün lazımdır. Bəzi splaysinq faktorları da məlum RNT helikazalara ardıcıllıq homologiyası nümayiş etdirirlər, bu faktorlar yəqin ki, splaysosomal slaysing tsikli zamanı snRNT-lər arasında baş verən əsas-cütlərinin yenidən düzlənməsi üçün lazımdır. RNT polimeraza II-nin CTD-si heptapeptid təkrarların serin 2 qalığında transkripsiyanın elonqasiya faktoru T-CDK-9 vasitəsilə fosforlaşarkən bir sıra splaysing faktorları onunla assosasiya edir (bax Şəkil 9-21). Bu assosasiya bu splaysinq faktorlarını RNT plolimeraza II-nin RNT çıxışı saytı yaxınlığında toplayıb qatılaşdırır, beləliklə onlar splays saytında polimerazadan çıxan kimi sürətlə splaysosomları toplaya bilirlər.



ŞƏKİL 10-9 Splaysinq prosesinin erkən dövründə pre-mRNT ilə U1 snRNT və U2 snRNT arasında əsas cütlərinin əmələ gəlməsi. (a) Bu diaqramda snRNT-lərin splaysinqi zamanı dəyişilməyən ikinci quruluşları sxemnatik şəkildə çəkilmişdir. Burada mayanın şaxələnmə nöqtəsi ardıcıllığı göstərilmişdir. Qeyd edək ki, U2 snRNT şaxələnmə-nöqtəsi A-nın daxil olduğu ardıcıllıqla əsas cütü əmələ gətirir, hərçənd ki, bu qalıqlar əsas cütü əmələ gətirməmişdirlər. Sistemli qırmızı dəri vərəmi (systemic lupus erythematosus - SLE) avtoimmun xəstəliyinə tutulmuş xəstədən alınan qan zərdabı, məlum olmayan səbəblərdən snRNP zülalların anticismlərinə malik olur, bu da splaysinq reaksiyasının komponentlərinin xarakterizə olunmasında faydalı olmuşdur. Bənövşəyi düzbucaqlılar, anti-Sm aniticismlərlə tanınan snRNP zülalların birləşdiyi ardıcıllıqları göstərir. (b) Yalnız U1 snRNP-lərin 5′ sonluğu və pre-mRNT-nin 5′ splays saytları göstərilmişdir. (*Solda*) U1 snRNT-nin 5′ sonluğu ilə əsas cütü əmələ gətirməklə müdaxilə edən pre-mRNT-nin splays saytındakı mutasiyası (A) splaysinqi blok edir. (*Sağda*) Əsas cütünün əmələ gətirməsini bərpa edən kompensasiya mutasiyalı (U) U1 snRNT-nin ekspressiyası, mutant pre-mRNT-nin splaysinqini də bərpa edir. Bax M.J. Moore et al., 1993, R.Gesteland and J. Atkins eds. *The RNA World*. Cold Spring Harbor Press, pp. 303-357; həmçinin bax Y. Zhung and A.M. Weiner, 1986, *Cell*, 46:827.



Şəkil 10-10 RNT-RNT spiralında qabarıb çıxmış A-nın və splaysinq prosesisndəki aralıq məhsulun quruluşu. (a) RNT dupleksin diaqramı qabarıb çıxan A-nın quruluşunu təyin etmək üçün istifadə edildi. 5-ci vəziyyətdə qabarıb çıxan A-lar (qırmızı) komplementar əsaslarla yaranmış (mavi və yaşıl) RNT-RNT dupleksinin hibridindən çıxarılmışdır. (b) Quruluşun rentgen-kristalloqrafiya analizi göstərir ki, qabarıb çıxan A qalıqları RNT-RNT spiralının yanından uzanıb çıxır. Bir zəncirin fosfat özülü yaşıl rəngdə, digər zəncirinki isə mavi rəngdə göstərilmişdir. Sağ tərəfdəki quruluş görünmək üçün spiral oxundan aşağıya doğru 90 dərəcə döndərilmişdir. (c) U2, U4, U5 və U6 snRNP-lərə malik olan splaysosomal splaysinqin aralıq məhsuslunun 40 Å rezalyusiyalı quruluşu krioelektron mikroskopiya və təsvirin rekonstruksiyası yolu ilə müəyyən edilmişdir. U4/U6/U5 tri-snRNP kompleksi, bu kompleksin boyundan altda üçbucaqlı bədənə bənzər quruluşuna malikdir, bu göstərir ki, bu snRNP-lər burada göstərilən quruluşun aşağısında yerləşirlər və baş əsasən U2 snRNP-dən təşkil olunmuşdur. Bax, H. Stark and R. Luhrmann, 2006 *Annuş Rev. Biophys. Biomol.Struct.* **35**:435. [(a) və (b) hissələri J.A. Bergulund et al., 2001, *RNA* 7:682, PDB ID1i9x. (c) hissəsi E. Wolf et al., "Exon, intron and splice site locations in the spliceosomal B complex," *EMBO J.*, 2009, **28**(15):2283–2292; doi:10.1038/emboj.2009.171.]

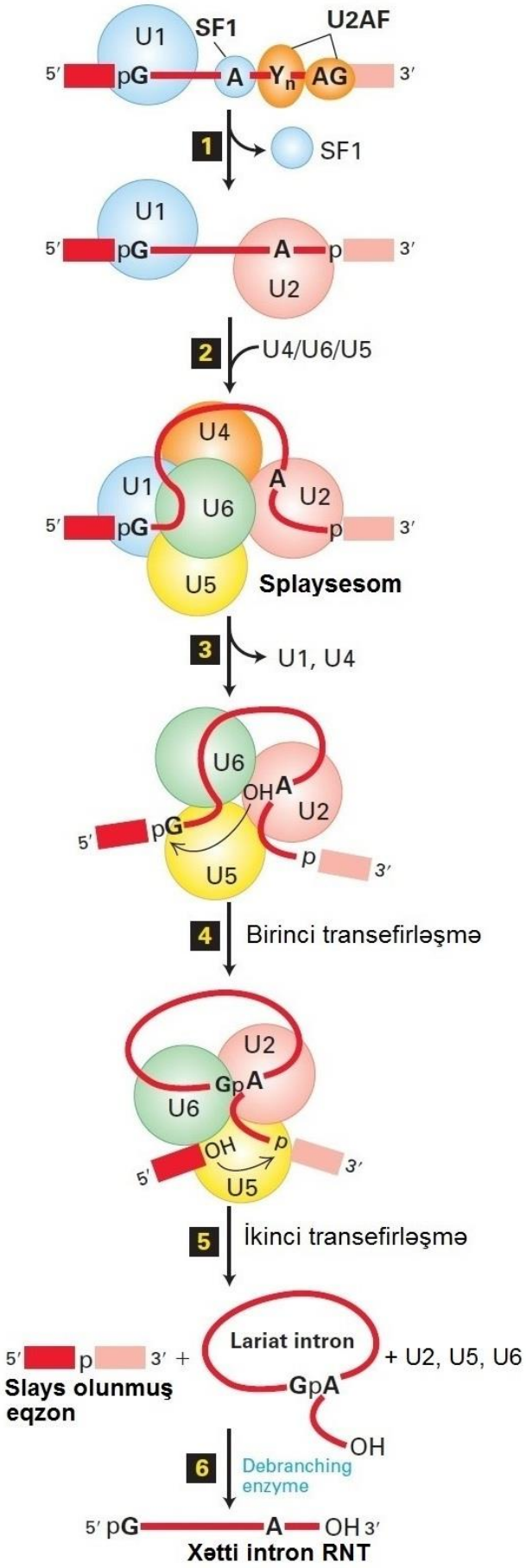
RNT splaysinqinin ardınca, hnRNP zülalların xüsusi dəsti hər bir eqzon-eqzon qovşaqda splays olunmuş RNT-yə təxminən 20 nukleotid 5′ mövqeyində birləşmiş vəziyyətdə qalır və bununla **eqzon-qovşaq kompleksini** yaradır. Eqzon-qovşaq kompleksi ilə birləşmiş hnRNP zülallardan biri, 10.3 bölməsində müzakirə olunduğu kimi, tam prosess olunmuş mRNT-lərin nüvədən sitoplazmaya daşınmasında fəaliyyət göstərən *RNT eksport faktoru*dur (*REF*). Eqzon-qovşaq kompleksi ilə birləşmiş başqa zülallar, sitoplazmada keyfiyyət-nəzarəti mexanizmində fəaliyyət göstərir və düzgün splays olunmamış mRNT-lərin nonsens-vasitəslə dağılma kimi məlum olan parçalanmasına aparır (Fəsil 10.4).

Pre-mRNT-lərin kiçik bir fraksiyası (insanlarda ~1 faiz) konsensus ardıcıllığa uyğun gəlməyən splays saytları olan intronlara malikdir. Bu sinif intronlar adi "GU-AG qaydası"na (bax Şəkil 10-7) uyğun olmadan AU ilə başlanır və AC ilə qurtarır. İntronların belə xüsusi sinfinin splaysinqi, Şəkil 10-11-də verilmiş analoji splaysinq tsikli ilə baş verir, yalnız bir istisna dörd yeni, az zənginliyə malik olan snRNP-lərin standart U5 snRNP ilə birlikdə iştirak etməsidir.

Onurğalıların, həşaratların və bitki hüceyrələrinin demək olar ki, bütün funksional mRNT-ləri, daxili intronların atılması və eqzonların splaysinqi yolu ilə müvafiq pre-mRNT-nin bir molekulundan törəmişlər. Amma, protozoanların iki tipində – tripanosomlarda və euqlenoidlərdə mRNT-lər ayrı-ayrı RNT molekullarının bir yerə splays olunması ilə qurulmuşlar. *Trans-spalysinq* adlandırılan bu proses, embrional inkişafın tədqiqində əhəmiyyətli model orqanizm kimi istifadə olunan *Caenorhabiditis elegans* nematodun (həlqəvi qurdun) da mRNT-lərinin 10-15 faizinin sintezində istifadə olunur. snRNP-lər vasitəsilə trans-splaysinq, tək bir pre-mRNT-dəki eqzonların splaysinqinə oxşar proseslə aparılır.

RNT polimeraza II ilə Zəncirin Elonqasiyası RNT-Prosessinqi Faktorlarının Mövcud Olması ilə Bağlıdır

RNT prosessinqi pre-mRNT-nin transkripsiyası ilə necə effektiv şəkildə birləşdirilir? Burada əsas rol, Fəsil 9-də müzakirə olunduğu kimi, yeddi-qalıqlı (heptapeptid) ardıcıllığın çoxsaylı təkrarlarından təşkil olunmuş RNT polimeraza II-nin karboksil-terminal domeninin (CTD) üzərinə düşür. İnsanın RNT polimeraza II-nin CTD domeni tam uzananda təxminən 130 nm uzunluğa çatır (Şəkil 10-12). CTD-nin kifayət qədər belə uzun olması, çoxsaylı zülalların eyni zamanda tək bir RNT polimeraza II molekulu ilə birləşməsinə imkan verir. Məsələn, yuxarıda qeyd olunduğu kimi, yeni sintez olunan transkriptə 5′ papağı tikən fermentlər, splaysinq və poliadenilləşmə faktorlarının etdiyi kimi, serin 5 ilə fosforlaşmış CTD-yə birləşirlər. Nəticədə, splays saytı və poliadenilləşmə siqnalı polimeraza tərəfindən transkripsiya olunanda, bu prosessinq faktorları yüksək lokal qatılıqda mövcud olurlar və RNT prosessinqinin sürətini və spesifikliyini artırırlar. Qarşılıqlı bir şəkildə hnRNP zülalların yeni sintez olunan RNT ilə birləşməsi RNT polimeraza II ilə DSIF və tsiklin T-CDK9 kimi elonqasiya faktorlarının qarşılıqlı əlaqəsini gücləndirir və transkripsiyanın sürətini artırır (bax Şəkil 9-21). Nəticədə, transkripsiyanın sürəti yeni sintez olunan RNT-nin hnRNP və RNT-prosessinqi faktorlarına birləşməsi sürəti ilə koordinasiya olunur. Bu mexanizm, pre-mRNT-nin prosessinqi mexanizmi düzgün yerləşdirilmədiyi təqdirdə onun sintez olunmamasını təmin edir.



ŞƏKİL 10-11 Pre-mRNT-nin splaysosom-vasitəsilə həyata keçən splaysinqinin modeli. Pillə 1: U1 konsensus 5′ splays saytla əsas cütü əmələ gətirdikdən sonra, SF1 (splays sayt 1) şaxələnmə nöqtəsi A-ya birləşir; U2AF (U2 snRNP assosasiya edən faktor) isə polipirimidin traktla və 3′ splays saytla assosasiya edir, U2snRNP isə Şəkil 10-9-da göstərilmiş əsas cütü əmələ gətirən qarşılıqlı təsir yolu ilə şaxələnmə-nöqtəsi A ilə assosasiya edir və SF1-i sıxışdırıb çıxarır. Pillə 2: U4, U5 və U6-nın trimer snRNP kompleksi splays**o**somu yaratmaq üçün ilkin kompleksl̀ə birləşir. Pillə 3: snRNT-lər arasında əsas cütü əmələ gətirmə əlaqələrinin yenidən təşkil olunması splaysosomu katalitik fəal konformasiyaya çevirir və U1 və U4 snRNP-lərin sabitliyini pozur, onları buraxır. Pillə 4: Belə güman olunur ki, U6 və U2 ilə formalaşan katalitik özək, sonra birinci transefirləşmə reaksiyasını kataliz edir, Şəkil 10-8-də göstərildiyi kimi, 2′, 5′ fosfodiefir əlaqələrinə malik olan aralıq məhsulu yaradır. Pillə 5: snRNP-lər arasında sonrakı yenidən düzulmələrin ardınca, ikinci transefirləşmə reaksiyası, 3′,5′-fosfodiefir əlaqələri ilə iki eqzonu birləşdirir və lariat quruluş kimi intronu və qalan snRNP-ləri buraxır. Pillə 6: Kəsilmiş lariat intron debrançinq fermentlə xətti RNT-yə çevrilir. Bax T. Villa et al., 2002, *Cell* **109**:149.

ŞƏKIL 10-12 İnsanın RNT polimeraza II-nin uzanmış CTD ilə sxematik diaqramı. İnsanın RNT polimeraza II-nin tam uzanmış karboksil-terminal domeninin (CTD) və onu polimerazaya birləşdirən linker rayonun uzunluğu polimerazanın qlobulyar domenə olan nusbəti ilə göstərilmişdir. CTD özünün uzanmış formasında eyni zamanda müxtəlif RNT-prosessinqi faktorları ilə birləşə bilir. Bax P. Cramer , D.A. Bushnell and R.D. Kornberg, 2001, *Science* **292**: 1863.

SR zülallar Uzun Pre-mRNT-lərdə Eqzon Təyin Olunmasına Kömək Edirlər

İnsan genomunda eqzonun ümumi orta uzunluğu təxminən 150 əsasdır, halbu ki, intronların orta uzunluğu 3500 əsasa çatır və ən uzun intronlar 500 kə-dan yuxarı olur! 5′ və 3′ splays saytları və şaxələnmə nöqtəsi degenerativ (cırlaşan) olduqlarından, bu ardıcıllıqların çoxsaylı nüsxələri böyük ehtimalla təsadüfi şəkildə uzun intronlarında meydana çıxırlar. Nəticədə, uzun intronlara malik olan ali orqanizmlərdə bir yerə splays olunmalı eqzonları təyin etmək üçün əlavə ardıcıllıq məlumatları tələb olunur.

Eqzonların sərhəddini bildirən splays saytlarını təyin etmək üçün informasiya eqzon ardıcıllığı daxilində kodlaşdırılır. RNT-birləşdirən zülallar ailəsi, *SR zülallar*, eqzonlar daxilindəki *eqzon splaysinq enhanserləri* adlanan ardıcıllıqla qarşılıqlı əlaqəyə girirlər. SR zülallar əvvəldə müzakirə olunmuş hnRNP zülalların başqa bir yarımqrupudur və bir və ya daha artıq RRM RNT-birləşdirən domenlərə malik olur. Onlar həmçinin SR domenləri adlanan, bir neçə arginin (R) və serin (S) qalıqları ilə zəngin olan zülal-zülal qarşılıqlı əlaqəsi domenlərinə malik olurlar. SR zülallar eqzon splaysinq enhanserlərinə birləşərkən, eqzonu əhatə edən zülal-zülal qarşılıqlı əlaqələr şəbəkəsi vasitəsi ilə U1 snRNP-nin düzgün 5′ splays saytına və U2 snRNP-nin şaxələnmə nöqtəsinə kooperativ birləşməsinə kömək edir (Şəkil 10-13). SR zülalların, snRNP-lərin və başqa splaysinq faktorlarının (məsələn U2AF və SF1) eqzonda toplanan və ***çarpaz-eqzon tanıyan kompleks*** adlanan kompleksi, uzun pre-mRNT-lərdə eqzonların dəqiq təyinini mümkün edir.

SR zülalların eqzon splaysinq enhanserə birləşməsinə mane olan mutasiya, hətta onlar kodlaşdırılan aminturşu ardıcıllıqlarını dəyişmədikdə belə kross-eqzon tanınma kompleksinin formalaşmasına mane olurlar. Nəticədə, splaysinq zamanı təsir olunan eqzon "buraxılır" və sonda tam prosess olunmuş mRNT daxil olmur. Bu halda istehsal olunan xırdalanmış mRNT ya parçalanır ya da, qeyri normal fəaliyyət göstərən mutant zülallara translyasiya olunur. Bu tip mutasiyalar insanın bəzi genetik xəstəliklərində rast gəlinir. Məsələn, *onurğa əzələ atrofiyası* uşaq ölümlərinə səbəb olan ən çox rast gəlinən genetik xəstəliklərdən biridir. Bu xəstəlik, gen duplikasiyası nəticəsində meydana gələn iki yaxın genə, *SMN1* və *SMN2* genlərinə malik olan genom rayonunda baş verən mutasiyanın nəticəsidir. Bu iki gen eyni (identik) olan zülalı kodlaşdırır, SMN2 çox aşağı səviyyədə ekspressiya olunur, çünki eqzonun birində baş verən susan mutasiya SR zülalın birləşməsinə müdaxilə edib ona mane olur. Bu mutasiya, *SMN2* mRNT-lərin əksəriyyətində eqzon buraxılmasına səbəb olur. *SMN* genin siçanda yalnız bir nüsxəyə malik olan homoloqu hüceyrənin həyat qabliyyəti üçün çox vacibdir. İnsanlarda onurğa əzələ atrofiyası SMN1-i fəalsızlaşdıran homoziqot mutasiyanın nəticəsində baş verir. Düzgün splays olunmuş SMN2 mRNT-nin kiçik fraksiyasından translyasiya olunan az miqdarda zülal embriogenez zamanı hüceyrənin həyatilik qabliyyətinin saxlanması və dölün inkişafı üçün kifayət edir, amma bu uşaqlıqda onurğa beyninin motor (hərəkətverici) neyronlarının həyat qabliyyətinin saxlanılması üçün kifayət etmir, nəticədə onların ölümünə və bununla bağlı olan xəstəliklərə səbəb olur.

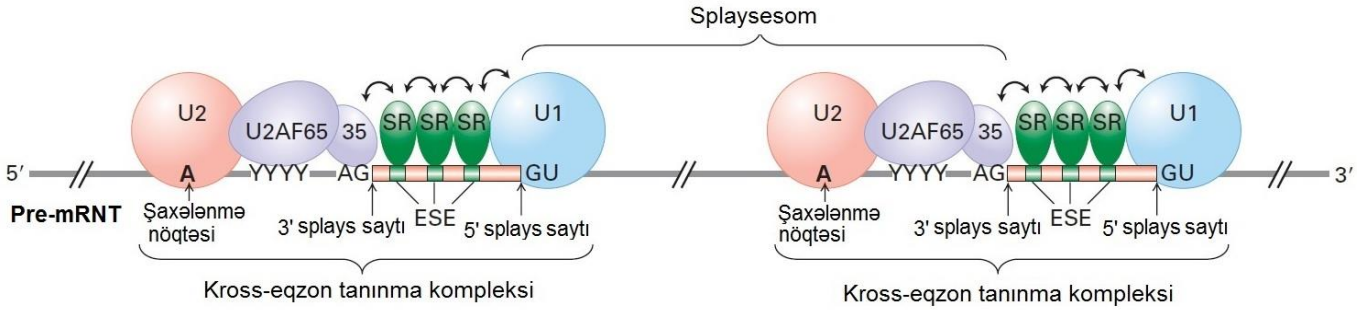
İnsanın genetik xəstəliklərinin yaranmasına səbəb olan tək-əsas-cütlü mutasiyaların təxminən 15 faizi düzgün *eqzon təyininin* müdaxiləsi ilə nəticələnir. Bu mutasiyalardan bəziləri 5′ və ya 3′ splays saytlarında baş verir, tez-tez hallarda normal gen ardıcıllığında mövcud olan, yaxınlıqdakı alternativ "sirli" (cryptic) splays saytlarının istifadəsi ilə nəticələnir. Normal splays sayt olmadıqda kross-eqzon tanıyan kompleks bu alternativ saytları tanıyır. Qeyri normal splaysinqin baş verməsinə səbəb olan başqa mutasiyalar, normal splays sayt əvəzinə tanınan yeni konsensus splays-sayt ardıcıllığın yaranması ilə nəticələnir. Nəhayət sonda, bəzi mutasiyalar spesifik SR zülalların pre-mRNT-yə birləşməsinə mane olur. Bu mutasiyalar, *SMN2* genində olduğu kimi, normal splays saytlarında splaysinqi ingibirləşdirir və beləliklə eqzon buraxılmasına səbəb olur.

DMD-də mutant eqzonların buraxılmasına səbəb olan, yuxarıda müzakirə edilənlərə oxşar olaraq, membran-keçirici olan sintetik oliqonukleotid törəmələrin daxil olduğu strategiyalar bu genetik xəstəliklərin müalicəsi üçün inkişaf etdirilməyə başlandı. Belə molekullar anormal splays saytını əmələ gətirən mutant ardıcıllığa hibridləşə bilirlər, U1 və ya U2 snRNT-lərin bu sayta birləşməsinə qəti şəkildə mane olurlar. Onurğa əzələ atrofiyası zamanı, tədqiqatçılar *SMN2* pre-mRNT-də çatışmayan eqzon splaysinq enhanserinə çox yaxın olan rayon ilə əsas cütü əmələ gətirən modifikasiya olunmuş oliqonukleotidləri sınaqdan keçirirlər. Tək zəncirə malik olan və zəngin SR zülallara birləşə bilən, hidroliz-olunmayan rayon *SMN2* genindən ekspressiya olunan pre-mRNT-lərdə eqzonların düzgün splaysinqini artırmaq üçün kross-eqzon tanınma kompleksinin toplanmasına kömək edir.

Özünü-Splaysinq Qrup II İntronlar snRNT-lərin Təkamülini Sübutlarla Təmin Edir

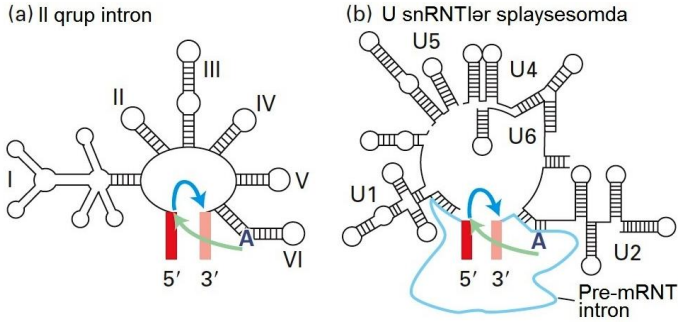
Müəyyən qeyri fizioloji in vitro şərait altında bəzi RNT transkriptlərin təmiz preparatları heç bir zülalın iştirakı olmadan tədricən splays edib intronları çıxarırlar. Bu müşahidələr, bəzi intronların *özünü-splaysinqinin* tanınmasına gətirib çıxardı. Özünü-splays intronların iki tipi aşkar olunmuşdur: *qrup I intronlar* protozoanların nüvə rRNT genlərində tapılmışdır və *qrup II intronlar*, bunlar zülal kodlaşdıran genlərdə və bəzi bitkilərdə və göbələklərdə mitoxondri və xloroplast rRNT və tRNT genlərində aşkar olunmuşdur. Özünü-splays intronların katalitik fəallığının aşkar olunması RNT funksiyaları barədə bizim düşüncələrimizdə bir inqilab oldu. Fəsil 5-də müzakirə olunduğu kimi, indi məlumdur ki, RNT ribosomlarda zülal sintezi zamanı peptid əlaqələrinin formalaşmasını kataliz edir. Biz burada, snRNT-lərin təkamül prosesində II qrup intronların, indiki dövrdə yalnız mitoxondri və xloroplast DNT-də tapılmış, ehtimal olunan rolunu müzakirə edirik, I qrup intronların fəaliyyətinə isə sonrakı bölmədə rRNT prosesinqində baxılır.

Hətta dəqiq ardıcıllıqları yüksək dərəcədə konservativ olmayan halda belə, bütün II qrup intronlar, çoxsaylı sütun-ilgəklərə malik olan konservativ mürəkkəb ikinci quruluşa düşürlər (Şəkil 10-14a). II qrup intronlarla özünü-splaysinq, aralıq məhsullar və nüvədə pre-mRNT splaysinqində tapılanlara analoji olan məhsullar da daxil olmaqla iki transefirləşmə reaksiyaları ilə baş verir. II qrup intronların özünü-splaysinqi ilə splaysesomal splaysinq arasındakı mexaniki oxşarlıq belə bir



ŞƏKİL 10-13 SR zülalların və splaysinq faktorlarının pre-mRNT-yə kooperativ birləşməsi ilə eqzon tanınması. Düzgün 5′ GU və 3′ AG splays saytları eqzonların yaxınlığında olmalarına əsasən splaysinq faktorları tərəfindən tanınırlar. Eqzonlar, SR zülalların birləşmə saytları olan eqzon splaysinq enhanserlərinə (ESE-lər) malikdirlər. ESE-lərə birləşərkən SR zülalları bir-biri ilə qarşılıqlı təsirdə olurlar və U1 snRNP-nin aşağıya istiqamətdə intronun 5′ splays saytına, SF1-ə birləşməsini və sonra da U2 snRNP-nin yuxarıya doğru intronun şaxələnmə nöqtəsinə, U2AF-in 65 və 35 kDa subvahidlərinin polipirimidin trakta və yuxarıya doğru intronun AG 3′ splays saytında və digər splaysinq faktorlara (göstərilmir) kooperativ birləşməsini təşviq edir. Nəticədə yaranan RNT-zülal kross-eqzon tanınma kompleksi eqzonu əhatə edir və RNT-nin spalysinqi üçün düzgün splays saytını fəallaşdırır. Qeyd etmək lazımdır ki, burada U1 və U2 snRNP-lər eyni splaysesomun hissələrini əmələ gətirmirlər. Sağ tərəfdə U2 snRNP eyni intronun 5′ ucuna birləşən U1 snRNP-nin splays**e**somunu əmələ gətirir. Sağda göstərilən U1 snRNP, aşağıya doğru intronun (göstərilmir) şaxələnmə nöqtəsinə birləşmiş U2 snRNP ilə splaysesomu yaradır, U2 snRNP isə sol tərəfdə yuxarıya istiqamətdə intronun (göstərilmir) 5′ splays saytına birləşmiş U1 snRNP ilə splaysesomu yaradır. Ikibaşlı oxlar zülal-zülal qarşılıqlı əlaqələrini göstərir. Bax T. Maniatis, 2002, *Nature* **418**:236; həmçinin bax S.M. Berget, 1995, *J.Biol.Chem.* **270**:2411.

fərziyyənin yaranmasına gətirdi ki, snRNT-lər, II qrup intronların ikinci quruluşunda sütun-ilgəklərə analoji olaraq fəaliyyət göstərirlər. Bu fərziyyəyə əsasən, funksiyasına görə II qrup özünü-splaysinq intronlarda olduğu kimi analoji üç-ölçülü RNT quruluşunu istehsal etmək üçün snRNT-lər pre-mRNT-nin 5′ və 3′ splays saytları ilə, həmçinin bir-digəri ilə qarşılıqlı əlaqəyə girirlər (Şəkil 10-14b).



ŞƏKİL 10-14 II qrup özünü-splaysinq intronların və splaysesomların müqayisəsi. Sxematik diaqramlar (a) II qrup özünü-splaysinq intronlar və (b) splaysesomlarda mövcud olan U snRNT-lərin ikinci quruluşunu müqayisə edir. Birinci transefirləşmə reaksiyası açıq yaşıl oxlarla göstərilmişdir; ikinci reaksiya isə mavi oxlarla göstərilir. Şaxələnmə nöqtəsi A yağlı hərflə göstərilir. Bu quruluşların oxşarlığı göstərir ki, II qrup intronlardakı splaysesom snRNT-lər II qrup intronlardan törəmişlər, trans-fəaliyyət göstərən snRNT-lərlə funksiyasına görə II qrup intronlardakı müvafiq domenlərə anolojidirlər. (a) və (b)-də intronlara cinah olan barlar eqzonları göstərir. Bax P.A. Sharp, 1991, *Science* **254**:663.

Bu fərziyyənin davamı odur ki, qədim əcdad pre-mRNT-lərdəki intronlar II qrup özünü-splaysinq intronlardan, daxili RNT quruluşlarının proqressiv şəkildə itirilməsi ilə yaranıb inkişaf etmişlər və eyni funksiyaları həyata keçirən, trans-fəaliyyət göstərən snRNT-lərlə eyni vaxtda yaranıb inkişaf etmişlər. Bu tipli təkamül modellərinin dəstəklənməsi II qrup intronların, domen V və domen I-in bir hissəsinin silindiyi mutantlar ilə aparılan eksperimentlərdən irəli gəlir. Belə mutant intronlara malik olan RNT transkriptlər özünü-splaysinq üçün qüsurlu olurlar, amma in vitro reaksiya zamanı silinmiş rayonlara ekvivalent olan RNT molekulları əlavə olunanda özünü-splaysinq baş verir. Bu kəşf göstərir ki, II qrup intronlarda bu domenlər, snRNT-lər kimi trans-fəaliyyər göstərə bilirlər.

II qrup intronların özünü-splaysinq mexanizminin pre-mRNT-nin splaysesomal splaysinqinin mexanizmi ilə oxşarlığı göstərir ki, splaysinq reaksiyası splaysesomların zülal komponentləri ilə deyil, snRNT ilə kataliz olunnur. Baxmayaraq ki, II qrup intronlar in vitro yuxarı temperaturlarda və Mg^{2+} qatılığında özünü-splays edə bilirlər, in vivo şəraitdə, II qrup intron RNT-lərə birləşən *maturazalar* adlanan zülal sürətli splaysinq üçün tələb olunur. Maturazalar güman olunur ki, iki splaysinq transefirləşmə reaksiyalarını kataliz etmək üçün tələb olunan intron RNT-lərin dəqiq üç-ölçülü qarşılıqlı təsirini stabilləşdirir. Analoji olaraq, güman olunur ki, splaysesomlardakı snRNP zülalları, snRNT-lərin və pre-mRNT splaysinqinin kataliz olunması üçün tələb olunan intron nukleotidlərinin dəqiq geometriyasını stabilləşdirir.

snRNT-lərin təkamüli ali eukariotların sürətli təkamülünün əhəmiyyətli pilləsidir. Özünü-splaysing ardıcıllıqları intronlardan itən kimi və onların RNT splaysinqində funksiyası trans-fəaliyyət göstərən snRNT-lərlə sıxışdırılıb çıxarıldıqdan sonra, qalan intron ardıcıllıqları divergensiya etmək üçün sərbəst olmuşlar. Bu öz növbəsində, çox güman ki, eqzon sürüşməsi yolu ilə yeni genlərin yaranmasına şərait yaratmışdır, çünki bu proses zamanı yaranmış yeni intronların ardıcıllıqlarında bir sıra məhdudiyyətlər vardır (bax Şəkil 8-18 və 8-19). Bu həmçinin, alternative RNT splaysinqinin nəticəsi olan zülalların müxtəlifliyinin artmasına və tənzimlənən RNT splaysinqi yolu ilə gen nəzarətinin əlavə səviyyəsinin yaranmasına imkan yaratmışdır.

Pre-mRNT-lərin 3′ Kəsilməsi və Poliadenilləşməsi Sıx Şəkildə Bağlıdır

Eukariot hüceyrələrində, histon mRNT-lərdən* başqa bütün mRNT-lər *3′ poli(A) quyruğa* malikdirlər. Puls-nişanlanmış adenovirus və SV40 RNT-nin erkən tədqiqatları göstərmişlər ki, əsas virus transkriptləri poli(A) quyruğun uzandığı saytdan kənara çıxırlar. Bu nəticələr göstərir ki, A qalıqları, daha uzun transkriptin endonukleolitik doğranmasınadan yaranan 3′ hidroksilə əlavə olunurlar, amma güman olunan aşağıya istiqamətdəki RNT fraqmentləri, yəqin ki, onların tez parçalanmalarına görə heç vaxt in vivo aşkar olunmamışdırlar. Lakin, hər iki güman olunan parçalanma məhsullarının aşkar olunması, kultura olunan insan hüceyrələrinin nüvə ekstraktları ilə həyata keçirilən in vitro prosessinq reaksiyaları zamanı müşahidə edilmişdir. Doğranma/poliadenilləşmə prosesi və doğranma saytından aşağıya olan RNT-nin parçalanması bu in vitro reaksiyalarda həddən ziyadə zəif şəkildə baş verir, bu da aşağıya istiqamətdə doğranma məhsullarının aşkar olunmasını sadələşdirir.

Heyvan hüceyrələrinin kDNT klonlarının erkən ardıcıllıq oxunmaları göstərdi ki, mRNT-lərin demək olar ki, hamısı poli(A) quyruqdan 10-35 nukleotid yuxarıya doğru AAUAAA ardıcıllığına malikdir (Şəkil 10-15). Templeyt DNT-də müvafiq ardıcıllığın, çox yaxın olan bir ardıcıllıq (AUUAAA) istisna olmaqla istənilən başqa ardıcıllığa mutasiya olunması ilə RNT transkriptlərin poliadenilləşməsi faktiki olaraq ləğv olunur. Belə mutant templeytlərdən istehsal olunan prosess olunmamış RNT transkriptlər nüvədə toplanmırlar və tez bir şəkildə parçalanırlar.Daha sonra aparılan mutagenez tədqiqatları aşkar etdi ki, doğranma saytından aşağıya istiqamətdə olan ikinci siqnal heyvan hüceyrələrində per-mRNT-lərin əksəriyyətinin səmərəli şəkildə kəsilməsi və poliadenilləşməsi üçün tələb olunur. Bu aşağıya istiqamətdəki siqnal xüsusi ardıcıllıq deyil, əksinə, kəsilmə saytından təxminən 20 nukleotid məsafə daxilində olan GU-zəngin və ya sadəcə olaraq U zəngin rayondur.

Pre-mRNT-nin doğranması və poliadenilləşməsi üçün tələb olunan zülalların identifikasiyası və təmizlənməsi Şəkil 10-15-də göstərilən modelin alınmasına səbəb oldu. Beş müxtəlif polipeptiddən təşkil olunmuş 360 kDa-luq kəsilmə və poliadenilləşmə faktoru (CPSF), əvvəlcə yuxarıya istiqamətdə olan AAUAAA poliadenilləşmə siqnalı ilə qeyri-stabil kompleks əmələ gətirir. Sonra, CPSF-RNT kompleksinə ən azı üç əlavə zülal birləşir: GU-zəngin ardıcıllıqla qarşılıqlı əlaqə yaradan, *kəsilmə stimullaşdırıcı faktor* (*cleavage stimulatory factor – CStF*) adlanan 200 kDa heterpotrimer; *kəsilmə faktoru I* (*CFI*) adlanan 150 kDa-luq heterotetramer; ikinci heterodimer doğrama faktoru (CFII). Güman olunur ki, *Simplekin* adlanan 150 kDa-luq zülal, bu kəsilmə/poliadenilləşmə faktorlarının toplandığı skafoldu) yaradır. Nəhayət sonda, *poli(A) polimeraza* (*PAP*) kəsilmə baş verməmişdən *öncə* kompleksə birləşməlidir. PAP birləşmənin belə tələb olunması kəsilməni və poliadenilləşməni elə əlaqələndirir ki, əmələ gələn 3′ sonluq tez bir şəkildə poliadenilləşir və müdafiəsiz qalmış 3′ sonluğun eqzonukleaza ilə parçalanmasında heç bir əhəmiyyətli informasiyalar itirilmir.

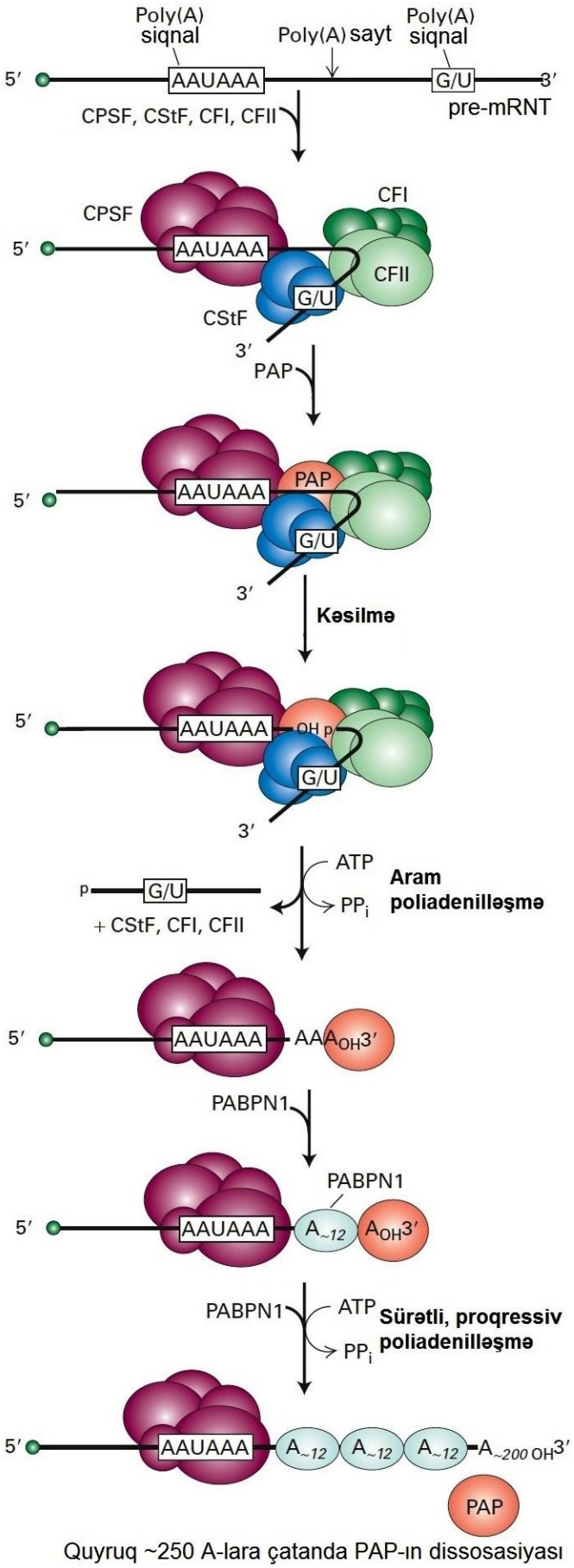
Böyük, çoxzülallı **kəsilmə/poliadenilləşmə kompleksinin** pre-mRNT-də AU-zəngin poliadenilləşmə siqnalı ətrafında toplanması bir çox cəhətinə görə, transkripsiyanın preinisiasiyası kompleksinin templeyt DNT molekulunda AT-zəngin TATA boksda formalaşmasına oxşardır (bax Şəkil 9-19). Hər iki halda çoxzülallı komplekslər, zülal-nuklein turşusu və zülal-zülal qarşılıqlı əlaqələrinin xüsusi şəbəkəsi ilə kooperativ şəkildə toplanır.

Poli(A) saytındakı kəsilmənin ardınca poliadenilləşmə iki fazada davam edir: ilk 12 və ya nisbətən artıq A qalıqlarının əlavə olunması yavaş-yavaş baş verir, bunun ardınca 200-250 və ya daha artıq A qalıqları sürətlə əlavə olunur. Sürətli faza, RRM motifə malik olan *poli(A)-birləşdirən zülalların* çoxsaylı nüsxələrinin birləşməsini tələb edir. Bu zülal, onu sitoplazmada mövcud olan poli(A) birləşdirən zülaldan PABPC1 fərqləndirmək üçün *PABPN1* kimi işarələnir. PABPN1 ilkin olaraq PAP ilə əlavə olunmuş qısa A quyruğa və AAUAAA poliadenilləşmə siqnalı ilə birləşmiş CPSF-ə kooperativ birləşir. Bu birləşmə poli(A) quyruğun sürətli və proqressiv uzunaması üçün PAP-ı stimullaşdırır, yəni poli(A) quyruğu PABPN1 və CPSF kompleksindən azad etmədən uzadır. Poli(A) quyruq 250 adenin qalığına çatanda bu proqressivlik itir və PAP poli(A)-PABPN1 kompleksindən dissosasiya edir, A əlavə edilməsini dayandırır (bax Şəkil 10-15). PABPN1-in poli(A) quyruğa birləşməsi mRNT-nin sitoplazmaya eksport olunması üçün çox vacibdir. Splaysinq faktorlarında olduğu kimi, kəsilmədə və poliadenilləşmədə iştirak edən zülalların da bir sıra subvahidi, RNT polimeraza II-nin serin 2-də fosforlaşmış CTD-i ilə assosasiya edirlər, bu onları RNT-də poliadenilləşmə siqnallarının elonqasiya edən polimerazadan çıxdığı rayonda cəmləşdirir.

Təbii formalı genlərdə RNT polimeraza II transkripsiyanı poliadenilləşmə saytından 2 kə daxilində mümkün olan çoxsaylı saytlardan istənilən birində terminasiya edir. SV40 və adenovirusla (hər ikisi DNT virusudur) aparılan eksperimentlər göstərdi ki, poliadenilləşmə siqnalı mutasiya olunanda RNT polimeraza II transkripsiyanı terminasiya etmir, virus genomundakı növbəti poli(A) saytına rast gələnə qədər davam edir. Tezliklə oxşar nəticələr insanın adenovirusa keçirilmiş rekombinant β-qlobin geni üçün də göstərildi. Bu eksperimentlər göstərdi ki, transkripsiyanın RNT polimeraza II vasitəsilə terminasiyası transkriptin kəsilməsi və poliadenilləşməsi ilə bağlıdır. Belə fərz edilir ki, bu yeni sintez olunan RNT-nin 5′ ucunun mühafizəsinin ləğv olunmasına görədir. Kəsilmiş RNT-nin 5′ ucunda papaq olmadığından o, XPN1 5′→3′ eqzoribonukleazaya asanlıqla məruz qalır. Belə güman edilir ki, bu eqzoribonukleaza hələ də transkripsiya edən polimerazaya çatanda, o ya yeni sintez olunan RNT-nin 3′ sonluğunu polimerazanın fəal mərkəzindən dartıb çıxarmaqla ya da polimerazada transkripsiyanın terminasiyasına səbəb olan konformasiya dəyişilməsini etməklə terminasiyanı işə salır.

Yeni sintez olunan RNT elonqasiya edən polimerazadan uzaqlaşdırıldıqdan sonra, RNT polimeraza II sıxac ilə polimeraza daxilindəki RNT-DNT hibrid arasındaki əlaqələr (bax Şəkil 9-15) itirilir, sıxaclar açılaraq polimerazanı DNT tem-

*Əsas histon mRNT-lər repliksiya edən hüceyrələrdə S faza zamanı həddən artıq böyük səviyyədə təkrarlanan genlərdən transkripsiya olunurlar. Onlar 3′-sonluqlu prosessinqin, kəsilmənin daxil olduğu, amma poliadenilləşmə olmayan xüsusi formasına məruz qalırlar. Histon mRNT translyasiaysına kömək edən xüsusiləşmiş RNT-birləşdirən zülallar by xüsusiləşmiş sistem tərəfindən yaradılmış 3′ sonluğa birləşirlər.



ŞƏKIL 10-15 Məməlilərin hüceyrələrində pre-mRNT-nin kəsilmə və poliadenilləşmə modeli. Kəsilmə və poliadenilləşmə spesifikliyi faktoru (CPSF) yuxarıya istiqamətdə AAUAAA poli(A) siqnala birləşir. CStF aşağıya istiqamətdəki GU- və ya U-zəngin ardıcıllıqla və birləşmiş CPSF ilə əlaqəyə girir və RNT-də ilgək əmələ gətirir; CFI və CFII-nin birləşməsi kompleksin stabilləşməsinə kömək edir. Sonra, poli(A) polimerazanın (PAP) birləşməsi, adətən poliadenilləşmə siqnalının 3′ sonluğundan 10-35 nukleotidə olan poli(A) kəsilmə saytında kəsilməni stimullaşdırır. Kəsilmə faktorları, tez şəkildə parçalanan, aşağıya istiqamətdə RNT doğranması məhsulu kimi buraxılır. Sonra birləşmiş PAP təxminən 12 A qalığını yavaş sürətlə kəsilmə reaksiyası zamanı yaranmış 3′-hidroksil qrupuna əlavə edir. Nüvə poli(A)-birləşdirən zülalın (PABPN1) ilkin qısa poli(A) quyruğa birləşməsi PAP vasitəsi ilə əlavə olunmanın sürətini artırır. 200-250 A qalığının əlavə olunmasından sonra, PABPN1 polimerləşməni dayandırmaq üçün PAP-a siqnal verir.

mpleytdən azad edir. Son zamanlar RNT polimeraza II anticismi ilə aparılan xromatin-immunçökdürmə tədqiqatları (ChIP-seq) (bax Şəkil 9-18) göstərdi ki, polimeraza poli(A) saytından aşağıya doğru 2 kə daxilində mümkün olan çoxsaylı saytlarda templeyt DNT-dən uzaqlaşdırıla bilir.

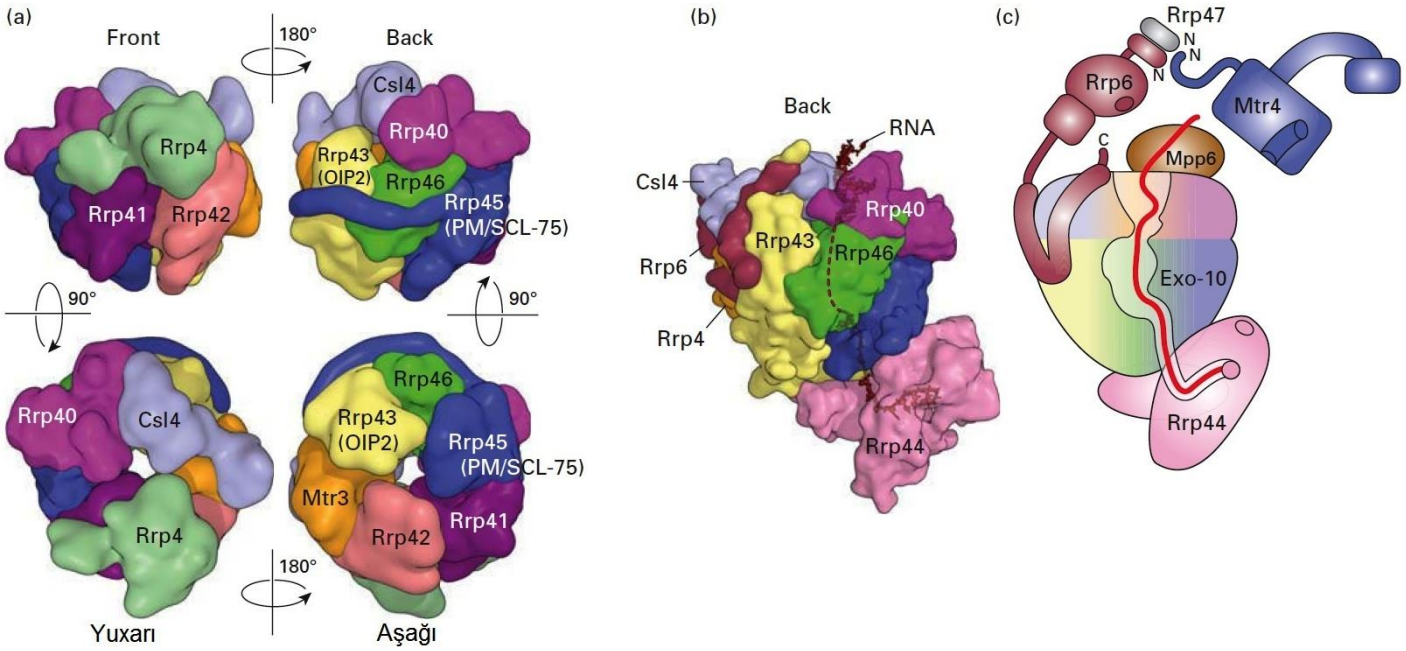
Nüvə Eqzoribonukleazaları Pre-mRNT-lərdən Prosess Olunub Çıxmış RNT-ləri Parçalayır

İnsan genomu uzun intronlara malik olduğundan, transkripsiya zamanı RNT polimeraza II ilə polimerləşmiş nukleotidlərin cəmi 5 faizə yaxını prosessinq olunmuş, yetkin mRNT-lərdə saxlanılır. Hərçənd ki, bu prosess sərfəli görünmür, o yəqin ki, çoxhüceyrəli orqanizmlərdə ona görə inkişaf etmişdir ki, eqzon qarışdırılması prosesi uzun intronlara malik olan orqanizmlərdə yeni genlərin təkamülünə (inkişafına) şərait yaratmışdır (Fəsil 8). Splays olunub çıxmış intronlar və kəsilmə/poliadenilləşmə saytından aşağıya olan rayon, nüvə eqzoribonukleazası vasitəsi ilə parçalanır.

Əvəllər qeyd olunduğu kimi kəsilib çıxarılmış intronlarda 2′,5′-fosfodiefir əlaqəsi şaxələnməni itirən (debranching) fermentlə hidroliz olunur (bax Şəkil 10-11, pillə 6), müdafiə olunmamış uclara malik olan xətti molekul əmələ gəlir. Belə xətti RNT molekullarına eqzonukleazalar hücum edə bilir, (daxili fosfodiefir əlaqələrini qıran endoribonukleazaların əksinə olaraq) RNT zəncirinin 5′ və ya 3′ ucundan hər dəfəyə bir əsası hidroliz edir. RNT parçalanmasının dominantlıq edən mexanizmi 5′→3′ eqzonukleazalar xassəsinə malik olan, **eqzosomlar** adlanan böyük zülal kompleksində (~400 kDa) doğranmaq yoludur (Şəkil10-16). (Sonra müzakirə edildiyi kimi, eqzosomlar sitoplazmada da fəaliyyət göstərirlər.) Eqzosomlqar bir çox xüsusiyyətlərinə görə, poliubikvitinləşmiş zülalları sitoplazmada və nüvədə parçalayan proteosomlarla oxşardır (bax Şəkil 3-31). Eqzosomun predominant fəal mərkəzi kompleksin daxilində yerləşir, burada o yalnız kompleksin yuxarısında məsaməyə daxil olmuş bir-zəncirli RNT-ləri parçalaya bilir (Şəkil 10-16b). Məsamə çox kiçik olduğundan iki-zəncirli və başqa quruluşu əmələ gətirən RNT-nin oraya daxil olmasına imkan vermir. Komplekslə assosasiyada olan başqa zülallara əsas cütlərini qıran və RNT-nin məsamə daxilinə girməsinə mane olan RNT zülal qarşılıqlı əlaqələrini qıran RNT helikazalar daxildirlər.

İntronlardan başqa, eqzosomlar düzgün splays olunmayan və ya poliadenilləşməyən pre-mRNT-ləri də parçalayır, hərçənd ki, bu vaxta qədər aydın deyil ki, eqzosom düzgün prosess olunmayan pre-mRNT-ni necə tanıyır (fərqləndirir). Amma, temperatura həssas mutant PAP-a malik olan maya hüceyrələrində (Şəkil 10-15), yolverilməyən temperaturda pre-mRNT-lər nüvədə öz transkripsiya saytlarında saxlanılırlar. Belə qeyri normal prosess olunmuş pre-mRNT-lər hüceyrədə, sitoplazmada deyil, yalnız nüvədə tapılan eqzosomların subvahidindəki ikinci mutasiya (Rrp6, bax Şəkil 10-16) ilə buraxılırlar. Bundan başqa, aşkar olunmuşdur ki, eqzosomlar *Drosophila* politen xromosomlarda transkripsiya saytlarında toplanırlar, burada onlar RNT polimeraza II elonqasiya faktorları ilə assosasiya edirlər. Bu nəticələr göstərir ki, eqzosomlar, hələ də tam anlaşılmayan keyfiyyət-nəzarəti mexanizmində iştirak edirlər və aberrant (anormal) prosessinq olunmuş pre-mRNT-ləri tanıyaraq onların sitoplazmaya eksport olunmasına mane olurlar və nəticədə parçalanmalarına səbəb olurlar.

Nüvə eqzonukleazaları tərəfindən parçalanmaqdan qorunmaq üçün yeni sintez olunan transkriptlər, pre-mRNT prosessinqinin aralıq məhsulları və nüvədəki yetkin mRNT-lərin ucları qorunmalıdır. Yuxarıda müzakirə olunduğu kimi, yeni sintez olunan transkriptin 5′ ucu polimerazadan çıxan kimi papaq quruluşun 5′ uca əlavə olunması ilə qorunur. 5′ papaq, onu 5′ eqzonukleazalardan qoruyan və mRNT-nin nüvədən sitoplazmaya eksportunda fəaliyyət göstərən heterodimer *nüvə papaq-birləşdirən kompleksl*ə (*cap-binding complex* - CBC) birləşdiyinə görə qorunur. Yeni sintez olunan transkriptin 3′ sonluğu RNT polimeraza daxilndə yerləşir, ona görə də eqzonukleazalar üçün əlçatmaz olur (bax Şəkil 5-12). Əvəllər müzakirə olunduğu kimi, poli(A) siqnaldan aşağıya doğru pre-mRNT-nin doğranması ilə əmələ gəlmiş 3′ sonluq, başqa 3′ prosessinq faktorları ila əlaqədə olan PAP vasitəsi ilə tez şəkildə poliadenilləşir, nəticədə yaranmış poli(A) quyruq PABPN1 ilə birləşmiş olur (Şəkil 10-15). Doğranma və poliadenilləşmənin belə sıx şəkildə birləşməsinin ardınca PABPN1 birləşməsi baş verir, 3′ sonluğu eqzonukleazaların hücumundan qoruyur.



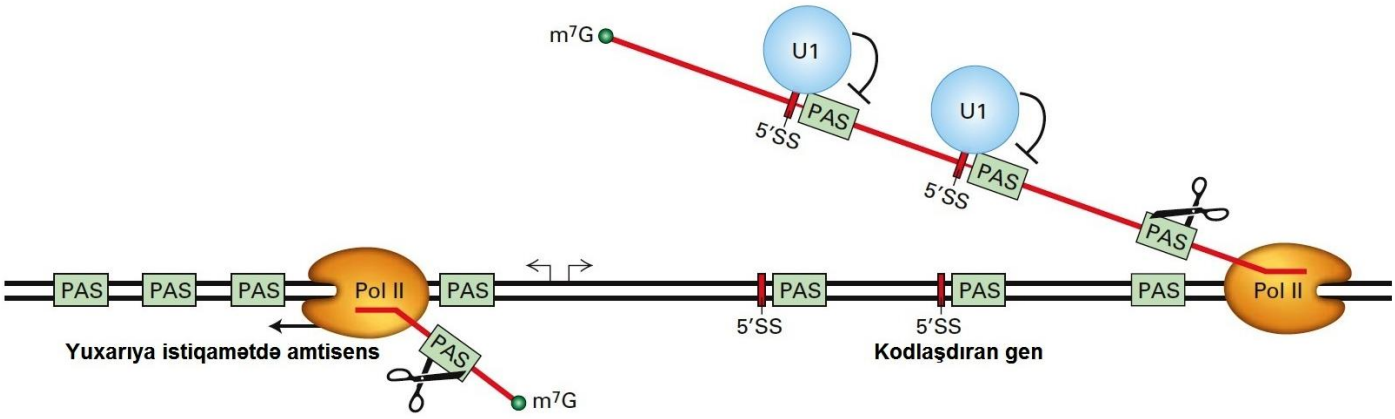
ŞƏKİL 10-16 Eqzosomun quruluşu. (a) Katalitik qeyri fəal eqzosom özəyi. Doqquz subvahidli, 286 kDa insan eqzosom özəyi *E. coli*-də yüksək sıviyyədə ekspressiya olunan Rrp41, Rrp45, Rrp42, Mtr3, Rrp46, Rrp4, Rrp40 və Csl4 subvahidlərdən in vitro toplanmışdır(bax Şəkil 6-29). Onun quruluşu rentgen-kristalloqrafiya yolu ilə 3.35Å rezolyusiyada təyin edilmişdir. (b) Sitoplazmadakı 10-subvahidli katalitik fəal olan eqzosom. Orientasiyası (a) hissəsində yuxarı sağ tərəfdəki təsvirə oxşardır. Amma saat əqrəbinin əksi istiqamətində yüngülcə fırlanmışdır. Prosessiv 3′→5′ eqzonukleaza fəallığı, özəyin aşağısı ilə assosasiyada olan onuncu subvahid Rrp44 (bənövşəyi) ilə təmin edilir. Nüvə eqzosomunda onbirinci subvahid Rrp6-nın C-sonluğu tünd qırmızı rəngdə göstərilir. Yuxarıda iki-zəncirli rayonu olan RNT və özək məsamələrinə daxil olan 3′ bir-zəncirli rayon qara rəngdə göstərilir. (c) 14 subvahidli nüvə eqzosomunun diaqramı. Eqzo-10 (B)-də göstərilən 10-subvahidli kompleksi təmsil edir. Rrp6 və Rrp47 heterodimeri (b)-də göstərildiyi kimi, eqzosom özəyin yuxarısında Rrp6-nın C-sonluq domeni vasitəsilə Csl4 ilə assosasiya edir. RNT helikazanın N-sonluğu Mtr4 (mavi) Rrp6 və Rrp47-nin heterodimerləşmə domeni ilə assosasiya edir. Yuxarıdakı ilə assosasiya edən başqa bir subvahid, Mpp6 insanın nüvə eqzosomunda Mtr4 RNT helikazası ilə də assosasiya edir, amma onun quruluşu və Mpp6-Mtr4 qarşılıqlı əlaqənin detalları təyin olunmamış qalmaqdadır. Bir-zəncirli RNT-nin eqzosomlardan keçən yolu qırmızı rəngdə verilmişdir. Prosessiv eqzonukleaza Rrp44-də eqzonukleaza fəal mərkəzi bənövşəyi dairələrlə göstərilmişdir. Rrp44-də endonukleaza fəallıq mərkəzi bənövşəyi oval göstərilmişdir. Qeyri-prosessiv 3′→5′ eqzonukleaza fəallıq mərkəzi tünd qırmızı oval göstərilmişdir. Bax B. Schuch et al., 2014. *EMBO J.* **33**:2829. [(a) hissəsi Q. Liu, J. C. Greimann, and C. D. Lima, 2006, *Cell* **127**:1223-dən. Part (b) D. L. Makino, M. Braumgartner, and E. Conti, 2013, *Nature* **495**:70. PDB ID 4ifd-dən.]

RNT Prosessinqi Metazoanların Genomunda Yayılmış Transkripsiyanın Problemini Həll Edir

Fəsil 9-da müzakirə edildiyi kimi, metazoan hüceyrələrində transkripsiya edən RNT polimeraza II-nin yerinin analizi təccübləndirici nəticələri aşkar etdi, belə ki, polimeraza demək olar ki, promotorların əksəriyyətində təxminən bərabər tezlikdə aşağıya istiqamətdə kodlaşdırıcı rayonlara qədər, yuxarıya istiqamətdə isə kodlaşdırıcı rayonlardan kənara transkripsiya edir (bax Şəkil 9-18). Bu kəşf metazoan hüceyrələrindən ayrılmış kiçik RNT-lərin dərin ardıcıllıq oxunmaları ilə təsdiq olundu, məməlilərin promotorlarının 70 faizə qədərini təşkil edən CpG ada promotorlardan həm sens həm də antisens istiqamətdə transkripsiya olunan papaq tikilmiş qısa RNT-lərin aşağı miqdarı aşkar edildi. Həqiqətən də bütün hüceyrə RNT-lərinin dərin ardıcıllıq oxunmaları göstərdi ki, demək olar ki, bütün genomun hər iki zənciri transkripsiya olunur, hərçənd ki, nəticədə yaranan RNT-lərin çoxu həddən artıq aşağı qatılıqda, təxminən hər hüceyrəyə bir molekuldan az miqdarda mövcud olur. Bu kəşf belə bir sualın: hüceyrə belə "yayılmış transkripsiya" ilə necə bacarır sualının yaranmasına səbəb oldu.

Aşağı zənginlikdə olan bu qısa, papaq tikilmiş RNT-lərin ardıcıllıq oxunması analizləri göstərdi ki, böyük ehtimalla onların yüksək qatılığa çatmasına RNT prosessinqi ilə və anormal prosess olunmuş RNT-lərə olan nüvə nəzarəti ilə mane olunur. Bir sıra hüceyrə tiplərindən alınmış RNT-lərin ardıcıllığının oxunması aşkar etdi ki, sens istiqamətində kodlaşdırıcı ardıcıllığa doğru transkripsiya olunan transkriptlərə nisbətən antisens RNT-lər metazoanların çoxunda AT zəngin (məməlilərdə AT ~60 faiz təşkil edir) DNT ardıcıllığından transkripsiya olunan yüksək tezlikdə AAUAAA poliadenilləşmə siqnal ardıcıllıqlarına malikdirlər. Məməlilərin DNT-sinin yüksək AT tərkibi olduğuna görə antisens transkriptdə AAUAAA ardıcıllığın ardınca tez-tez hallarda pre-mRNT kəsilmə/poliadenilləşmə siqnalının aşağıya istiqamətdə həqiqi elementi kimi fəaliyyət göstərən U zəngin ardıcıllıq gəlir (bax Şəkil 10-15). Bu kəsilmə/poliadenilləşmə siqnalları kodlaşdırıcı rayonlar daxilində gedən transkriptlərdə çox seyrək ortaya çıxırlar. Onların mRNT ardıcıllığında istər intronlarda, istərsə də eqzonlarda olmasından asılı olmayaraq, harada rast gəlinirlərsə, adətən U1 snRNT-nin konsensus əsas-cütü əmələgətirmə saytından aşağıya istiqamətdə yerləşirlər və aşkar edilmişdir ki, yaxınlıqdakı AAUAAA ardıcıllıqlarından sonra kəsilmə/poliadenilləşməni supressiya edirlər.

Bu mRNT-lərin 3′ uclarının prosessinqi üçün istifadə edilən kəsilmə/poliadenilləşmə siqnallarının olduğu hal deyil, çünki U1 snRNT poli(A) saytından uzaqda, 5′ ucdakı terminal intronla assosasiya edir. Bundan başqa, yuxarıda müzakirə edildiyi kimi, RNT polimeraza II vasitəsilə transkripsiya bir qayda olaraq pre-mRNT-nin kəsilməsindən və poliadenilləşməsindən sonra ~2 kə daxilində sona çatır. Nəticədə, poly (A) saytların zənginləşməsi və U1 snRNT üçün bağlanma saytlarının nisbətən itirilməsi antisens transkriptlərdə bu transkriptlərin əksəriyyətinin transkripsiyanın başlama saytından ~ 2 kə daxilində kəsilmə/poliadenilləşmə faktorları ilə kəsilməsinə (bax Şəkil 10-15), ardınca da transkripsiyanın dayandırılmasına (Şəkil 10-17) səbəb ola bilər. Kəsilmiş antisens transkriptlər yəqin ki, pre-mRNT-lərin splays olunmuş intronlarını və sonrakı bölmələrdə müzakirə olunan prosess olunmuş rRNT və tRNT seləflərin ardıcıllıqlarını parçalayan eyni nüvə eqzonukleazaları vasitəsilə dağıdılır (bax Şəkil 10-1). Nəticədə, hətta böyük sayda polimerazaların "yanlış" istiqamətdə transkripsiya etmələrinə baxmayaraq, bu yolla yaranan transkriptlərin əksəriyyəti sürətlə dağıdılır.



ŞƏKİL 10-17 Metazoanlarda əksər promotorlardan "yanlış" istiqamətdə transkripsiya olunan RNT yüksək tezlikdə poliadenilləşmə siqnallarına və aşağı tezlikdə U1 snRNT birləşmə saytlarına malikdirlər. Bu nümunə transkripsiyanın əksəriyyəti üçün təxminən 2 kə-dan sonra "yanlış" istiqamətdə transkripsiyanın sona çatmasına səbəb ola bilər. PAS, RNT-yə transkripsiya olunan DNT-də kodlaşdırılan poliadenilləşmə siqnallarını göstərir. Yuxarıya istiqamətdə transkripsiya olunan transkriptlərin doğranması (qayçı), guman edilir ki, nüvə eqzosomları ilə və nüvə 5′→3′ eqzonukleaza XRN1 ilə dağıdılan sərbəst RNT uclarını yaradır. Əksinə, kodlaşdırıcı ardıcıllığa transktipsiya edən RNT polimeraza II ilə sintez olunan pre-mRNT bir neçə poliadenilləşmə siqnallarını yaradıb inkişaf etdirmişdir. Onlar harada rast gəlinsələr də, bu siqnallar adətən U1 snRNT birləşmə saytının önündə olurlar, və yaxınlıqdakı PAS parçalanmanı ingibirləşdirirlər (stop işarəsi). Amma, mRNT-nin 3′ sonluğunu yaratmaq üçün istifadə olunan PAS-ın sıx şəkildə assosasiya etdiyi U1 RNP birləşdirmə saytı yoxdur. Bax A.E. Almada al., 2013, *Nature* **499**:360.

10.1 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSIYALARI

Eukariotik pre-mRNT-nin Prosessinqi

- Eukariotik hüceyrələrin nüvəsində pre-mRNT-lər hnRNP zülallarla assosasiyada olurlar və sitoplazmaya daşınmazdan öncə 5′ papağın tikilməsi, 3′ sonluğun kəsilməsi, poliadenilləşmək və splaysinq olunmaqla prosessinq olunurlar (bax Şəkil 10-2).
- Transkripsiyanın inisiasiyasından az sonra, papaq tikən fermentlər RNT polimeraza II-nin heptapeptid təkrarların serin 5 qalığında transkripsiyanın inisiasiyası zamanı TFIIH vasitəsi ilə çox sayda fosforlaşmış karboksil-sonluqlu domeni (CTD) ilə birləşir. Sonra bu fermentlər, yeni sintez olunan transkript 25 nukleotid uzunluğa çatdıqda ona sürətlə 5′ papağı əlavə edirlər. RNT splaysinqinə və 3′ kəsilməyə və poliadenilləşməyə daxil olan başqa RNT-prosessinqi faktorları, CTD heptapeptid təkrarların 2-ci serin qalığı fosforlaşarkən onunla assosasiya edirlər, transkripsiyanın elonqasiyasının sürətini artırırlar. Ona görə də, RNT prosessinqi faktorları CTD ilə assosasiya etməyincə və yeni sintez olunan pre-mRNT polimerazanın səthindan çıxan kimi onunla qarşılıqlı əlaqəyə hazır olmayınca transkripsiya yüksək sürətlə davam etmir.
- Beş müxtəlif snRNP-lər splaysosomy yaratmaq üçün pre-mRNT ilə və bir-biri ilə əsas cütü əmələ gətirməklə qarşılıqlı əlaqəyə girirlər (bax Şəkil 10-11). Bu çox böyük ribonukleozülal kompleksi iki trnansefirləşmə reaksiyasını kataliz edərək iki eqzonu birləşdirir və intronu lariat quruluş kimi uzaqlaşdırır, o isə sonra parçalanır (bax Şəkil 10-8).
- Eqzonlarda *eqzon splaysinq enhanser* ardıcıllığına birləşən SR zülallar ali orqanizmlərin böyük pre-mRNT-lərində eqzonların təyin olunması üçün kritik əhəmiyyətə malikdirlər. SR zülallar, snRNP-lər və splaysinq faktorları arasında qarşılıqlı əlaqə şəbəkəsi düzgün splays sayta spesifik olan kross-eqzon tanınma kompleksini formalaşdırır (bax Şəkil 10-13).
- Guman olunur ki, splaysesomlarda snRNT-lər, II qrup özünü-splaysinq intronlara oxşar olan ümumi üçüncü quruluşa malikdirlər.
- Ali orqanizmlərin uzun transkripsiya vahidində eqzonların splaysinqi adətən pre-mRNT-lərin formalaşmasının hələ də davam etdiyi zamanda başlayır. mRNT-nin 3′ sonluğunu yaratmaq üçün kəsilmə və poliadenilləşmə poli(A) sayt transkripsiya olunduqdan sonra başlanır.
- Zülal kodlaşdıran genlərin əksəriyyətində konservativ AAUAAA poli(A) siqnal kəsilmənin və poliadenilləşmənin baş verdiyi poli(A) saytdan çox az yuxarıya istiqamətdə yerləşir. Poli(A) saytdan aşağıya istiqamətdə GU- və ya U-zəngin ardıcıllıq kəsilmə və poliadenilləşmənin səmərəliliyinə kömək edir.
- Poli(A) polimerazanın (PAP) daxil olduğu çoxzülallı kompleks pre-mRNT-nin poliadenilləşməsini və kəsilməsini aparır. Nüvə poli(A)-birləşdirən zülal, PABPN1 A qalıqlarının PAP vasitəsi ilə əlavə olunmasını stimullaşdırır və poli(A) quyruq 250 qalığa çatdıqdan sonra onların əlavə edilməsini dayandırır (bax Şəkil 10-15).
- Kəsilib çıxarılmiş intronlar və parçalanma/poliadenilləşmə saytından aşağıya istiqamətdə olan RNT əsasən 3′→5′ eqzonukleazalara malik olan çoxzülallı kompleks eqzosomlarla dağıdılır. Eqzosomlar düzgün prosess olunmamış pre-mRNT-ləri də dağıdır.

10.2 Pre-mRNT Prosessinqinin Tənzimlənməsi

İndi biz gördük ki, pre-mRNT-lər yetkin, funksional mRNT-lərə necə prosess olunurlar, bu prosesin tənzimlənməsinin gen nəzarətinə necə kömək edə biləcəyinə baxaq. Fəsil 8-dən yada salaq ki, ali eukariotlar onların DNT-sində kodlaşdırılan həm sadə həm də mürəkkəb transkripsiya vahidlərinə malikdirlər. Birincidən istehsal olunan əsas transkriptlər bir poli(A) saytına malikdirlər və hətta çoxsaylı intronlar mövcud olduqda belə yalnız bir formada RNT splaysinqi nümayiş etdirirlər, beləliklə bir transkripsiya vahidi yalnız bir mRNT kodlaşdırır. Əksinə, mürəkkəb transkripsiya vahidlərindən (insanın transkripsiya vahidlərinin ~92-94 %) istehsal olunan əsas transkriptlər alternativ yolla prosess olunaraq fərqli zülalları kodlaşdıran başqa mRNT-ləri əmələ gətirə bilirlər (bax Şəkil 8-3).

Alternativ Splaysinq Eqzonların Fərqli Kombinasiyası ilə Transkriptləri Yaradır

Ali orqanizmlərdə transkripsiya vahidlərinin böyük bir fraksiyasının alternativ splays olunmuş mRNT-ləri kodlaşdırmasının və fərqli splays olunmuş mRNT-lərin müxtəlif hüceyrə tiplərində ekspressiya olunmasının kəşf olunması aşkar etdi ki, RNT splaysinqinin tənzimlənməsi ali eukariotlarda çox əhəmiyyətli gen-nəzarəti mexanizmidir. Hərçənd ki, pre-mRNT-lərdə alternativ poli(A) saytların kəsilməsi üzrə çoxsaylı misallar məlumdur, bir mürəkkəb transkripsiya vahidindən müxtəlif zülalları ekspressiya etmək üçün müxtəlif eqzonların **alternativ splaysinqi** daha çox geniş yayılmış ümumi mexanizmdir. Məsələn, Fəsil 5-də biz qeyd etdik ki, fibroblastlar hüceyrəxarici zülal fibronektinin bir tipini istehsal etdikləri halda, hepatositlər başqa tipini istehsal edirlər. Hər iki fibronektin **izoformalar** eyni transkripsiya vahidi ilə kodlaşdırılır, amma transkriptlər iki hüceyrə tipində fərqli splays olunaraq müxtəlif mRNT-ləri istehsal edirlər (bx Şəkil 5-16). Başqa hallarda, müxtəlif inkişaf və ətraf mühit siqnallarına cavab olaraq alternativ prosessinq eyni hüceyrə tipində eyni zamanda baş verə bilər. Biz birincisi, RNT prosessinqinin tənzimlənməsinin çox yaxşı başa düşülən nümunələrdən birini müzakirə edəcəyik, sonra isə biz, sinir sisteminin inkişafında RNT splaysinqinin yaratdığı nəticələri qısa şəkildə nəzərdən keçirəcəyik.

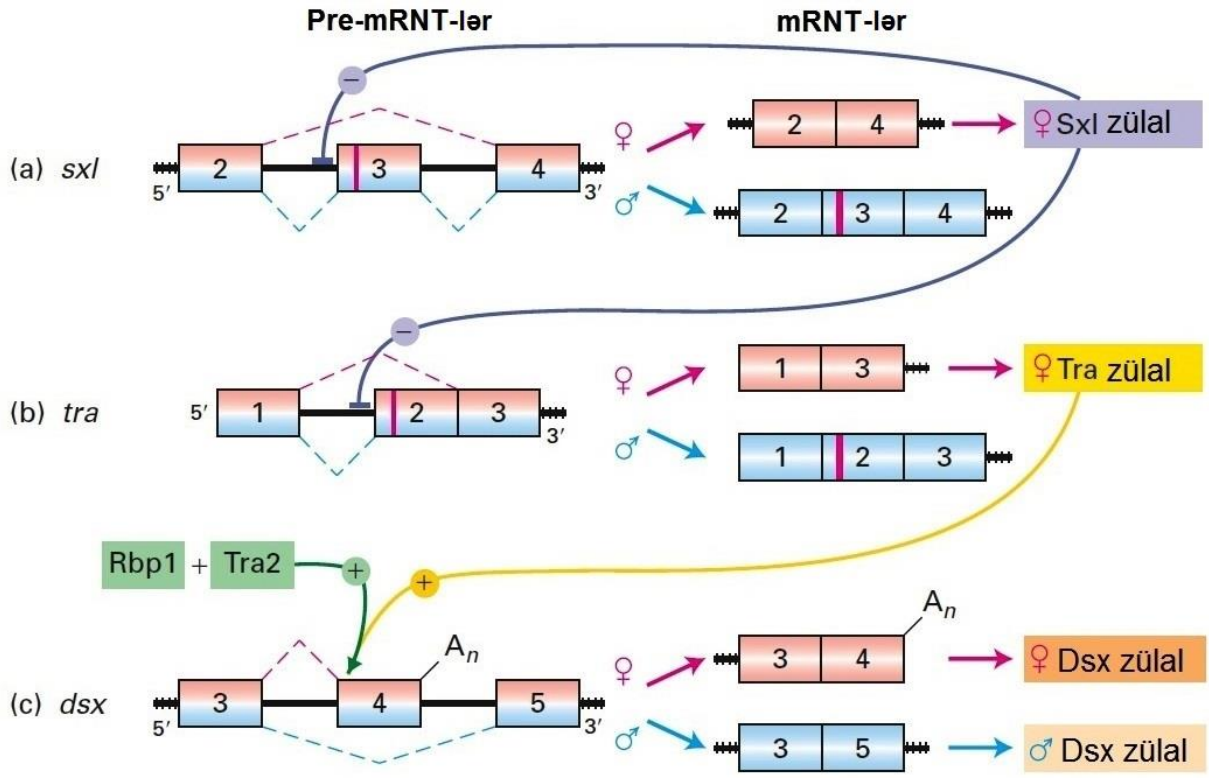
Tənzimlənən RNT Splaysinq Kaskadı *Drosophila*-da Cinsi Differensasiyaya Nəzarət Edir

Pre-mRNT-nin tənzimlənən alternativ splaysinqinin ilkin nümunələrindən biri *Drosophila*-da cinsi differensasiyanın tədqiqatlarından meydana çıxmışdır. *Drosophila*-nın normal cinsi differensasiyası üçün tələb olunan genlər ilk dəfə bu

prosesdə qüsurlu olan mutant *Drosophila*-nın ayrılması ilə xarakterizə olunmuşdur. Təbii formalı genlərlə kodlaşdırılan zülallar biokimyəvi xarakterizə olunarkən aşkar olunmuşdur ki, onlardan ikisi *Drosophila* embrionunda alternativ RNT splaysinqi kaskadını tənzimləyir. Son zamanların tədqiqatları, bu zülalların RNT prosessinqini necə tənzimlədiyini və nəticədə, əks cinsə xarakterik olan inkişafı supressiya edən iki müxtəlif cins-spesifik transkripsiya repressorlarının yaranmasına səbəb olması barədə bilikləri təmin etmişdir.

sex-lethal genlə kodlaşdırılan seks-letal (Sxl) zülal bu kaskadda fəaliyyət göstərən ilk zülaldır (Şəkil 10-18). Sxl zülal yalnız dişi rüşeyimlərdə mövcud olur. İnkişafın erkən çağında, gen yalnız dişi rüşeyimlərdə fəaliyyət göstərən promotorlardan transkripsiya olunur. İnkişafın sonrakı dövründə dişi-spesifik bu promotor dayandırılır və digər, *seks-letal* (*cinsiyyət-öldürücü*) promotor həm dişi, həm də erkək rüşeyimlərdə fəallaşır. Amma, Sxl zülal olmayan halda, erkək rüşeyimdəki *seks-letal* pre-mRNT-də eqzon 2 eqzon 3-ə splays olunur və ardıcıllığın əvvəlində stop kodona malik olan mRNT-ni istehsal edir. Son nəticə ondan ibarət olur ki, erkək rüşeyimlər inkişafın istər erkən və istərsə də sonrakı dövründə funksional Sxl zülalı istehsal etmirlər.

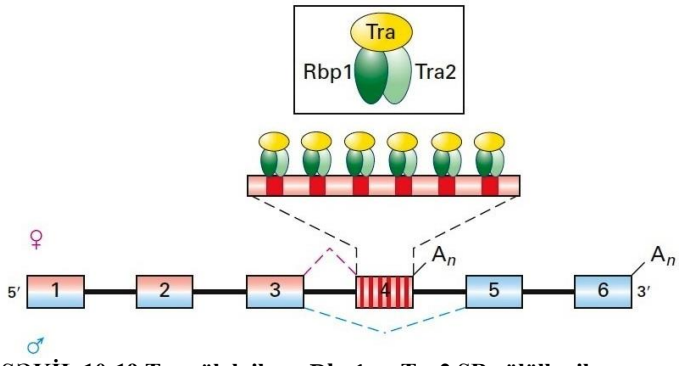
Əksinə, erkən dişi rüşeyimdə ekspressiya olunan Sxl zülal, *seks-letal* pre-mRNT-nin splaysinqini elə istiqamətləndirir ki, funksional *seks-letal* pre-mRNT istehsal olunur (Şəkil 10-18a). Sxl bunu, pre-mRNT-də eqzon 2 və eqzon 3 arasımdakı intronun 3′ sonluğuna yaxın ardıcıllığa birləşməklə həyata keşirir, bununla da U2AF ilə U2 snRNP-nin düzgün birləşməsini blok edir (bax Şəkil 10-11). Bunun nəticəsində, eqzon 2 ilə eqzon 3 arasındakı intronun 5′ ucuna birləşmiş U1 snRNP eqzon 3 ilə eqzon 4 arasındakı intronun 3′ ucundakı şaxələnmə nöqtəsinə birləşmiş U2 snRNP ilə splaysesomda toplanır, eqzon 3-ün *buraxılmasına* (*skipping*) və eqzon 2 ilə eqzon 4-ün splaysinqinə səbəb olur. *Seks-letal* pre-mRNT-də Sxl üçün birləşmə saytı, onun intronda yerləşməsinə və blok etmə funksiyasına və ya splays saytın istifadəsini "susdurmaq" kimi funksiyasına görə *intron splaysinq saylenseri* adlanır. Nəticədə alınan dişi fərd-spesifik *seks-letal* mRNT, dişi fərd rüşeyimlərində eqzon 3-ün buraxılmnasına səbəb olmaqda davam edərək öz ekspressiyasını gücləndirən funksional Sxl zülala translyasiya olunur. Erkək rüşeyimlərdə Sxl zülalın olmaması eqzon 3-ün daxil olmasına və nəticədə eqzon 3-ün 5′ ucu yaxınlığında yaranmış stop kodona görə funksional Sxl zülalın translyasiya olunmasına mane olur (bax Şəkil 10-18a).



ŞƏKİL 10-18 *Drosophila* rüşeymində cinsiyyətin inkişafına nəzarət edən tənzimlənən splaysinq kaskadı. Aydınlıq üçün, yalnız tənzimlənən splaysinqin baş verdiyi eqzonlar (bokslar) və intronlar (qara xətlər) göstərilmişdir. Splaysinq pre-mRNT-lərdən yuxarıda (dişi) qırmızı qırıq xətlərlə və aşağıda (erkək) göy qırıq xətlərlə göstərilmişdir. Eqzonlarda şaquli qırmızı xətlər, çərçəvədə funksional zülalların sintezinə mane olan stop kodonları göstərir. Yalnız dişi rüşeyimlər, (a) *sxl* pre-mRNT-də 2 və 3-cü eqzonlar arasında və (b) *tra* pre-mRNT-də 1 və 2-ci eqzonlar arasında splaysinqi repressiya edən funksional Sxl zülalı istehsal edirlər. (c) Əksinə, Tra zülalla iki SR zülalların, Rbp1 və Tra2-nin kooperativ birləşməsi, dişi rüşeyimdə *dsx* pre-mRNT-nin 3 və 4-cü eqzonları arasında splaysinqi və 4-cü eqzonun 3′ sonluğunda kəsilmə/poliadenilləşməni(A_n) *fəallaşdırır*. Funksional Tra olmayan erkək rüşeyimlərdə SR zülallar 4-cü eqzona birləşmir və uyğun olaraq 3-cü eqzon 5-ci eqzona splays olunur. Bu tənzimlənən splaysinq kaskadının nəticəsi kimi dişi və erkək rüşeyimlərdə istehsal olunan fərqli Dsx zülallar əks cinslərdə cinsi differensasiya üçün tələb olunan genlərin transkripsiyasını repressiya edir. Bax R. Gesteland and J. Atkins eds. *The RNA World*, Cold Spring Harbor Press, M.J. Moore et al., 1993, pp. 303-357.

Sxl zülal *transformer* genin pre-mRNT-sinin alternativ RNT splaysinqini də tənzimləyir (Şəkil 10-18b). Sxl ekspressiya olunmayan erkək rüşeyimlərdə, eqzon 1 funksional Transformer (Tra) zülalın sintezinə mane olan stop kodonu olmayan eqzon 2-yə splays olunur. Amma, dişi fərd rüşeyimlərdə, Sxl zülalın, 1-ci və 2-ci eqzonları arasındakı intronun 3′ sonluğundakı intron splaysinq saylenserə birləşməsi U2AF-in bu sayta birləşməsinə mane olur. Sxl-in *transformer* pre-mRNT ilə qarşılıqlı əlaqəsi zülaldakı RRM domeni vasitəsi ilə həyata keçirilir (bax Şəkil 10-5). Sxl birləşmiş olanda, U2AF pre-mRNT-də 3′-dən uzaq aşağı-affinli sayta birləşir, nəticədə eqzon 1 bu alternativ 3′ splaysinq saytına splays olunur və eqzon 2-nin stop kodon ilə birlikdə buraxılmasına səbəb olur. Nəticədə əmələ gəlmiş, əlavə konstitutiv splays olunmuş eqzonlara malik olan dişi-spesifik *transformer* mRNT funksional Tra zülalına translyasiya olunur.

Nəhayət, Tra zülalı, *ikicinsiyyətli* gendən transkripsiya olunan pre-mRNT-nin alternativ prosessinqini tənzimləyir (Şəkil 10-18c). Dişi rüşeyimlərdə Tra və iki konstitutiv ekspressiya olunmuş Rbp1 və Tra2 SR zülalların kompleksi eqzon 3 və eqzon 4-ün splaysinqini istiqamətləndirir və eqzon 4-ün 3′ sonluğunda alternativ poli(A) saytında kəsilmə/poliadenilləşməni təşviq edir, Dsx zülalın qısa, dişi fərd-spesifik variantının yaranmasına səbəb olur. Tra zülalını istehsal edə bilməyən erkək rüşeyimlərdə, eqzon 4 atılır və eqzon 3 eqzon 5-ə splays olunur. Eqzon 5, 3′ sonluğunda poliadenilləşmış eqzon 6-ya konstitutiv splays olunur – Dsx zülalın erkək-spesifik uzun varuantının yaranmasına səbəb olur. Eqzon 4-də Tra-nın birləşdiyi RNT ardıcıllığı, yaxınlıqdakı splays saytlarında splaysinqi gücləndiridyinə görə *eqzon splaysinq enhanseri* adlanır.



ŞƏKİL 10-19 Tra zülalı ilə və Rbp1 və Tra2 SR zülüllaı ilə splaysinqin fəallaşma modeli. Dişi *Drosophila* rüşeyimində, *dsx* pre-mRNT-də eqzon 3 və 4-ün splaysinqi Tra/Tra2/Rbp komplekslərin eqzon 4-də olan altı eqzon splaysinq enhanserlərə birləşməsi ilə fəallaşır. Tra olmayanda Rbp1 və Tra2 pre-mRNT-yə birləşə bilmədiyindən erkək rüşeyimlərdə eqzon 4 buraxılır. Müzakirə üçüm tekstə bax. A_n = poliadenilləşmə. Bax T. Maniatis and B. Tasic, 2002, *Nature* **418**:236.

Şəkil 10-18-də göstərilmiş tənzimlənən RNT prosessinqi kaskadının nəticəsində, erkək və dişi rüşeyimlərdə fərqli Dsx zülallar ekspressiya olunurlar. Bu iki zülal transkripsiya faktorudurlar, ümumi DNT birləşdirən domen də daxil olmaqla 1−3 eqzonlarla kodlaşdırılan N-sonluq ardıcıllığını bölüşürlər, amma dişilər eqzon 4 ilə, erkəklər isə eqzon 5 ilə və erkəklər üçün əlavə aşağıya istiqamətdə eqzonlarla kodlaşdırılan fərqli C-sonluq ardıcıllığına malikdirlər. Dişi zülalın unikal C-sonluğu güclü fəallaşdırıcı domen kimi fəaliyyət göstərdiyi halda erkək zülalının C-sonluğu güclü repressiya edici domendir. Nəticədə, dişi Dsx zülalı transkripsiya faktorı üçün birləşmə saytı ilə genləri, o cümlədən dişi xüsusiyyətləri inkişaf etdirən genləri fəallaşdırır, halbuki, erkək Dsx zülal eyni hədəf genləri repressiya edir.

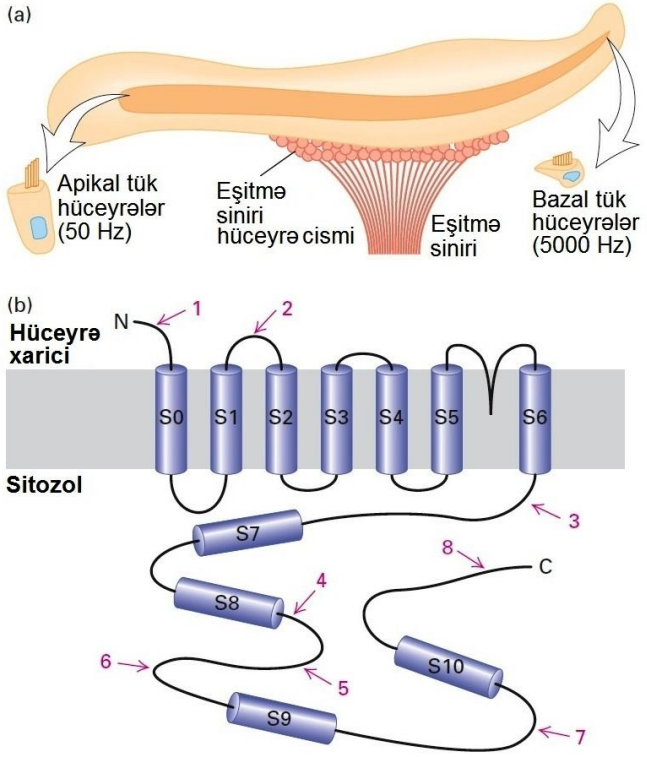
Şəkil 10-19 Tra/Tra2/Rbp komplekslərin *ikicinsiyyətli* (*dsx*) pre-mRNT ilə necə güman olunan qarşılıqlı əlaqəyə girdiyini təsvir edir. Rbp1 və Tra2 SR zülallardırlar, amma, onlar Tra zülalı olmayanda eqzon 4-lə əlaqə yarada bilmirlər. Tra zülalın Rbp1 və Tra2 ilə əlaqəyə girməsi hər üçü zülalın eqzon 4-də altı eqzon splaysinq enhanserinə kooperativ birləşməsi ilə nəticələnir. Sonra, birləşmiş Tra2 və Rbp1 zülallar, başqa SR zülalların konstitutiv splays olunan eqzonlarda etdiyi kimi (bax Şəkil 10-13), U2AF və snRNP zülalların eqzon 3 və 4 arasındakı intronun 3′ sonluğuna birləşməsini də təşviq edir. Tra/Tra2/Rbp1 komplekslər kəsilmə/poliadenilləşmə kompleksinin eqzon 4-ün 3′ sonluğuna birləşməsini də təşviq edir, çünki, U2 snRNP üstə gəl 3′ splays sayta birləşmiş assosasiyada olan zülallar kəsilmə/poliadenilləşmə faktorlarının (bax Şəkil 10-15) kooperativ birləşmə əlaqələri ilə müvafiq şəkildə yerləşmiş poliadenilləşmə siqnalına birləşməsini təşviq edir.

Splaysinq Repressorları və Aktivatorları Alternativ Saytlarda Splaysinqə Nəzarət Edirlər

Şəkil 10-18-dən göründüyü kimi, *Drosophila* Sxl zülal və Tra zülal əks təsirlərə malkidirlər: eqzonların buraxılmasına səbəb olmaqla Sxl splaysinqə mane olur, halbuki Tra splaysinqi təşviq edir. Oxşar zülalların təsiri insanlarda fibronektin izoformalarının hüceyrə-tipi-spesidik ekspressiyasını izah edə bilər (bax Şəkil 5-16). Məsələn, hepatositlərdə ekspressiya olunan Sxl-bənzər splaysinq repressor, fibronektin pre-mRNT-də EIIIA və EIIIB eqzonların splays saytlarına birləşə bilr və RNT splaysinqi zamanı onların buraxılmasına səbəb olur. Alternativ olaraq, fibroblastlarda ekspressiya olunan Tra-bənzər splaysinq aktivatoru EIIIA və EIIIB eqzonlara birləşmiş olan splays saytlarını fəallaşdıra bilir və bu eqzonların yetkin mRNT-yə daxil olmasına səbəb olur. Bəzi sistemlərdə eksperimental yoxlamalar aşkar etdi ki, bəzi hüceyrə tiplərində eqzonun daxil olması və digər hüceyrə tiplərində eyni eqzonun buraxılması bir sıra splaysinq repressorların (adətən hnRNP zülalların) və enhanserlərin (adətən SR zülalların) birlikdə təsirinin nəticəsidir. Repressorlar üçün RNT-birləşdirən saytlar eqzonlarda da ola bilər, ona görə də *eqzon splaysing saylanser*i adlanır. Eləcə də, splaysinq aktivatorlar üçün, birləşmə saytları intronlarda da ola bilir ki, onlar da *intron splaysinq enhanserləri* adlanır.

Eqzonların alternativ splaysinqi xüsusən sinir sistemində geniş yayılmışdır, həm onurğalılarda həm də onurğasızlarda neyronal inkişaf üçün tələb olunan çox zülalların çoxsaylı müxtəlif izoformalarının alınmasını həyata keçirir. Bu zülalları kodlaşdıran genlərin əsas transkriptləri, çox hallarda mərkəzi sinir sistemi daxilində anatomik cəhətdən müxtəlif nahiyələrdə ekspressiya olunan, bir sıra müxtəlif mRNT-ləri yarada bilən mürəkkəb splaysinq profilini nümayiş etdirirlər. Biz, bu prosesin sinir sisteminin funksiyasında kiritik əhəmiyyətə malik olan rolunu diqqət cəlb edən iki nümunədə nəzərdən keçirəcəyik.

Onurğalıların Tük Hüceyrələrində K^+-Kanalı Zülallarının Ekspressiyası Onurğalıların daxili qulağında kirpicikli neyronlar olan fərdi "*tük hüceyrələri*" səsin spesifik tezliyinə çox güclü cavab verirlər. Ən kiçik tezliyə (~50Hz) nizamlanan hüceyrələr daxili qulağı təşkil edən boruvari ilbizin (tubular cochlea) bir ucunda tapılmışdır, ən yüksək tezliyə (~5000 Hz) cavab verən hüceyrələr isə digər ucunda tapılmışdır (Şəkil 10-20a). Bu uclar arasındakı hüceyrələr tezliyin bu iki son hədləri arasındakı qradientinə cavab verirlər. Reptililərdə və quşlarda tük hüceyrələrinin köklənməsi bir komponenti (elementi), hüceyrə daxili Ca^{2+} ionlarının qatılığının artmasına cavab olaraq K^+ ionu kanalının açılmasıdır. Kanalın açılmasına səbəb olan Ca^{2+} qatılığı membran potensialının tərəddüt etdiyi tezliyi və beləliklə də hüceyrələrin hansı tezliyə kökləndiyini təyin edir.



ŞƏKİL 10-20 Müxtəlif tezlikli səslərin qəbul olunmasında alternativ splaysinqin rolu. (a) Toyuğun qulağında 5 mm uzunluqda borudan ibarət olan ilbiz, apikal ucda (*solda*) 50 Hz-dən bazal ucda (*sağda*) 5000 Hz qədər vibrasiya edən tezliyin qradientinə köklənən eşitmə tük hüceyrələrdən ibarət olan epiteliyə malikdir. (b) Ca^{2+}-la-fəallaşan K^+-kanalı yeddi transmembran α spirala (S0-S6) malikdir ki, bunlar da birləşərək kanalı əmələ gətirirlər. Dörd hidrofob rayonun (S7-S10) daxil olduğu sitoplazmatik domen, Ca^{2+}-a cavab olaraq kanalın açılmasını tənzimləyir. Kanalın, eyni əsas transkriptdən istehsal olunan, alternativ splays olunmuş mRNT-lərlə kodlaşdırılan izoformaları müxtəlif Ca^{2+} qatılıqlarında açılır və beləliklə də müxtəlif tezliklərə cavab verir. Qırmızı rəqəmlər, müxtəlif izoformalarda alternativ splaysinqin istehsal etdiyi müxtəlif amin turşuları ardıcıllığının olduğu rayonları göstərir. Bax K.P. Rosenblatt et al., 1997, *Neuron* **19**:1061.

Ca^{2+} ilə fəallaşan bu K^+ ion kanalını kodlaşdıran gen cox sayda alternativ splays olunmuş mRNT-lər kimi ekspressiya olunur. Bu alternativ mRNT-lərlə kodlaşdırılan müxtəlif zülallar fərqli Ca^{2+} qatılıqlarında açılır. Müxtəlif cavab tezliklərinə malik olan tük hüceyrələr onların borulu ilbizdə yerləşmə vəziyyətindən asılı olaraq kanal zülallarının fərqli izoformalarını ekspressiya edirlər. Zülallarda ardıcıllıq variasiyası çox mürəkkəbdir: mRNT-də alternativ eqzonların istifadə olunduğu an azı səkkiz rayon vardır, bunlar da zülalın 576 müxtəlif izoformasının sintezinə imkan verir (Şəkil 10-20b). Fərdi tük hüceyrələrindən alınmış mRNT-lərin PZR analizi aşkar etdi ki, hər bir tük hüceyrəsi, onların borulu ilbizdə yerləşmə mövqeyindən asılı olaraq müxtəlif formaların üstünlük (dominantlıq) təşkil etdiyi Ca^{2+}-la-fəallaşan K^+-kanalının müxtəlif alternativ mRNT-lərinin qatışığını ekspressiya edir. Belə əlamətdar düzülüş göstərir ki, Ca^{2+}-la-fəallaşan K^+-kanalı pre-mRNT-lərin splaysinqi, hüceyrəyə onun ilbizdə yerləşmə mövqeyi barədə informasiya verən hüceyrəxarici siqnallara cavab olaraq tənzimlənir.

Digər tədqiqatlar göstərdi ki, siçovulda Ca^{2+}-la-fəallaşan K^+-kanalının pre-mRNT-də alternativ splays saytlarının birində olan splaysinq, qarşılıqlı təsirdə olan digər neyronların sinaptik fəallığına cavab olaraq neyron depolyarlaşması nəticəsində spesifik proteinkinazanın fəallaşması ilə supressiya olunur. Bu müşahidə, splays sayta spesifik olan splaysinq repressorunun proteinkinaza ilə fosforlaşaraq fəallaşa bilmək ehtimalını artırır, proteinkinazanın fəallığı isə öz növbəsində sinaptik fəallıqla tənzimlənir. hnRNP və SR zülallar fosforlaşma yolu ilə və digər pos-translyasiya modifikasiyaları ilə geniş şəkildə modullaşdığından, çox güman ki, splays faktorların post-translyasiya modifikasiyası ilə alternativ RNT splaysinqinin kompleks tənzimlənməsi neyron funksiyasının modullaşmasında çox əhəmiyyətli rol oynayır.

Daxili qulaq ilbizinin K^+-kanalını kodlaşdıran genlərə oxşar olan çox nümunələr onurğalıların neyronlarında müşahidə olunmuşdur, bir tip neyronda spesifik gendən ko-ekspressiya olunan alternativ splays olunmuş mRNT-lər mərkəzi sinir sisteminin müxtəlif rayonlarında müxtəlif nisbi qatılıqlarda ekspressiya olunurlar. Neyronlarda ekspressiya olunan genlərin transkripsiya olunan rayonları daxilində mikrosatellit təkrarların sayının artması, çoxsaylı genlərdən transkripsiya olunan alternativ splays olunmuş mRNT-lərin nisbi qatılığının dəyişilməsinə səbəb ola bilər. Biz Fəsil 8-də, DNT replikasiyası zamanı geriyə sürüşmənin mikrosatellit təkrarların artmasına necə səbəb olduğunu müzakirə etdik (bax Şəkil 8-5). Ən azı 14 müxtəlif sinir xəstəlikləri neyronlarda ekspressiya olunan transkripsiya vahidi daxilində mikrosatellit təkrarların artması nəticəsində baş verir. Bu neyronların nüvə pre-mRNT-lərinin sadə ardıcıllıqlarının təkrarlanması nəticəsində meydana gələn uzun rayonlar alternativ splays olunmuş mRNT-lərin nisbi qatılığında anormallıqlara sbəb olur. Məsələn, daha geniş yayılmış bu tipli xəstəlik olan mitonik distrofiya ya bəzi xəstələrdə transkriptlərin birində CUG təkrarların sayının artması nəticəsində, ya da başqa xəstələrdə digər transkriptdə CCUG təkrarların nüsxələrinin artması nəticəsində yaranır. Bu təkrarların sayı bu genin normal haldakı təkrarlarından 10 dəfə və ya daha çox artıq olanda, anormallıqlar bu təkrarlanan ardıcıllıqlara birləşən iki hnRNP zülalların miqdarında müşahidə olunur. Bu anormallıq çox güman ona görə baş verir ki, belə xəstələrdə neyronların nüvəsində hnRNP-lər bu ardıcıllıqların

anormal dərəcədə yüksək qatılığı tərəfindən birləşdirilir və digər pre-mRNT-lərlə assosasiya edə bilmirlər. hnRNP zülalların belə müsadirə olunması, normal halda bu hnRNP zülallarla tənzimlənən çoxsaylı pre-mRNT-lərdə müxtəlif alternativ splaysinq saytlarınımn splaysinq olunma sürətinin dəyişilməsinə səbəb olur. Neyronların normal funksiyası üçün alternativ splaysinqin düzgün tənzimlənməsinin əhəmiyyətinə görə, insanlarda çoxsaylı sinir pozuntuları nüvə RNT-birləşdirən zülalların funksiyasının anormallığı ilə və splaysinq faktorları üçün birləşmə saytlarını əmələ gətirən mikrosatellit təkrarların artması ilə bağlıdır (Cədvəl 10-2).

Cədvəl 10-2 Alternativ RNT Splaysinqində Anormallıqla Bağlı Neyroloji Pozuntular

Xəstəliklər	Alternativ splaysinqlə əlaqə
Ataksiya telangiektaziya	*ATM* gen daxilində nöqtəvi mutasiya *ATM* transkriptlərdə azan splaysinqin yaranmasına səbə olur
Fasioskapulohumoral distrofiya (FSHD) (Sifət-skapular-humeral distrofiya)	Nüvə RNT-birləşdirən zülal FRG1-in itirilməsi çox pre-mRNT-lərdə dəyişilmiş splaysinqə səbəb olur
Davamsız-X-xromosom-assosasiyalı tremor/ataksia sindromu (FXTAS)	*FMR1* genində mutasiyadan öncə CGG təkrarların artması RNT-birləşdirən splays faktorların müsadirəsinə səbəb olur.
17-ci xromosomla əlaqəli olan Parkinsonizmlə bağlı olan alın-gicgah dimensiyası (FTDP-17)	*MAPT* gen daxilində nöqtəvi mutasiya alternativ splays olunmuş eqzon 10-a malik olan *MAPT* transkriptlərin səviyyəsinin dəyişilməsi ilə nəticələnir
Duşenne əzələ distrofiyası; Beker əzələ distrofiyası	*Distrofin* genində mutasiya və delesiyalar nəticəsində *distrofin* transkriptlərin dəyişilmiş splaysinqi
MYOTONIK DISTROFIYA (DM)	
DM1	*DMPK*-nın 3′ UTR-ında CUG-nin artması MBNL splays faktorunun səhv tənzimlənməsinə səbə olur və nəticədə hədəf MBNL pre-mRNT-lər səhv splaysinqi olunur
DM2	*ZNF9* intronda CCUG-nin artması CUG-BP1 splays faktorun səhv tənzimlənməsinə və CUG-BP1 hədəf pre-mRNT-lərin səhv splaysinqinə səbəb olur
I tip Neyrofibromatoz	Aberrant (azan) splaysinqə səbəb olan mutasiyalar da daxil olmaqla *NF1* genində çoxsaylı mutasiyalar
PARANEYROPLASTIK SİNİR POZUNTULARI (PND)	
Paraneoplastik opsoklonus-myoklonus-ataksiya (POMA)	Autoimmun anticismlər neyron-spesifik RNT-birləşdirən splays faktorlarının Nova ailəsini tanıyır; Nova nokaut siçanların fenonüsxəsi POMA
Hu sindromu (PEM/SN; paraneoplastik ensefalomyelit/sensor neyronopatiya)	Autoimmun anticismlər RNT-birləşdirən faktorların *Drosophila* splays faktoru ELAV-a yaxın olan Hu ailəsini tanıyır
Prader-Villi sindromu	Serotonin reseptoru *5-HT*$_{2c}$*R* transkriptlərin alternativ splaysinqinin tənzimlənməsinə cəlb olunan splaysinq saylenser elementə komplementar olan splaysinq tənzimləyici snoRNT-nin itirilməsi
Psixiotrik pozuntular	Şizofrenik xəstəliklərdə aberrant splays olunmuş transkriptlərin toplanması
Retinitis piqmentoza	U snRNP-assosasiyalı zülalları kodlaşdıran genlərin mutasiyası
Rett sindromu	YB-1 RNT-birləşdirən zülalla qarşılıqlı təsirdə olan MeCP2 kodlaşdıran genin mutasiyası; Rett sindromun siçan modeli aberrant pre-mRNT splaysinqini nümayiş etdirir
Onurğa əzələ atrofiyası	*SMN1* genində silinmə/mutasiya və *SMN2*-də splaysinq tənzimləyici elementlərin itirilməsi snRNP-nin biogenezində iştirak edən SMN-in çatışmayan səviyyəsinə səbəb olur
ONURĞA BEYİN ATAKSİYALARI	
SCA2, SCA8, SCA10 və SCA12	Triplet təkrarların artmasına görə mümkün olan RNT funksiyanın qazanılması; RNT birləşdirən splaysinq faktorlarla birbaşa və dolayı qarşılıqlı əlaqə.

Mənbə: Elsevier-in razılığı ilə Licatalosi, D. and Darnel, R., "Splicing regulation in neurologic disease," *Neuron*, 2006, 52:1, 93–101-dən yenidən çap olunur. Razılıq Copyright Clearance Center, Inc tərəfindən alınmışdır.

***Drosophila* Retinal Neyronlarında *Dscam* Izoformaların Ekspressiyası.** Tənzimlənən alternativ RNT prosessinqinin bu vaxta qədər aşkar olunan ən ifrat nümunəsi *Drosophila*-nın *Dscam* geninin ekspressiyası zamanı meydana çıxır. Bu gendə baş verən mutasiyalar milçəyin inkişafı zamanı aksonlar və dendritlər arasındakı normal sinaptik əlaqələrə mane olur. *Dscam*

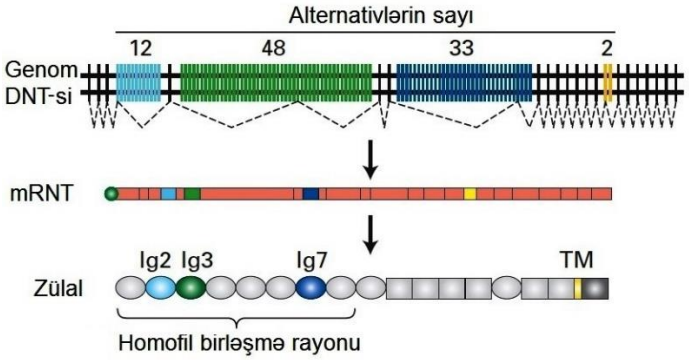
geninin analizi göstərdi ki, o 95 alternativ splays olunan eqzona malikdir (Şəkil 10-21), bunlar da 38016 mümkün olan izoformaların yaranmasına splays oluna bilərlər. Son zamanlar alınmış nəticələr göstərir ki, genin 22000 müxtəlif yolla splaysinq oluna bilən varianta malik olan *Drosophila* mutantları neyronlar arasındakı əlaqələrdə spesifik qüsurlara malikdirlər. Bu nəticələr göstərir ki, *Dscam* geninin mümkün olan izoformalarının əksəriyyətinin tənzimlənən RNT splaysinqi yolu ilə ekspressiyası *Drosophila* beyinində neyronlar arasında on millionlarla müxtəlif spesifik sinaptik əlaqələrin yaradılmasına kömək edir. Başa sözlə, beyində neyronların düzgün əlaqələndirilməsi tənzimlənən RNT splaysinqini tələb edir.

RNT Redaktəsi Bəzi Pre-mRNT-lərdə Ardıcıllığı Dəyişir

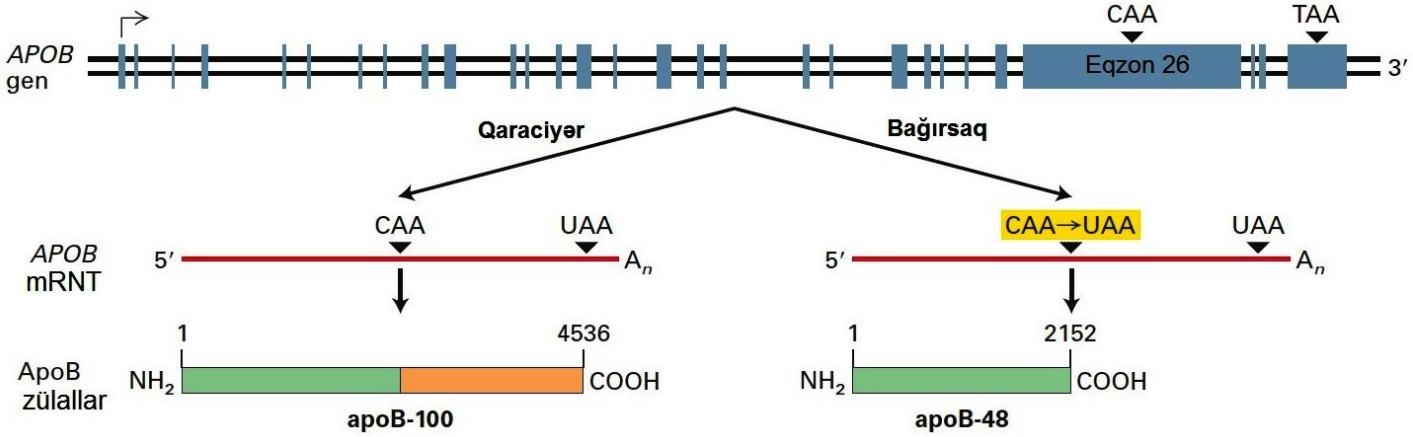
1980-ci illərin ortalarında, çoxsaylı müxtəlif orqanizmlərdən çox sayda kDNT klonların ardıcıllıqlarının və bunlara uyğun olan genom DNT-ləri ardıcıllıqlarının oxunması pre-mRNT prosessinqinin başqa tipinin gözlənilməyən kəşfinə səbəb oldu. **RNT redaktəsi** adlanan bu tip prosessinqdə pre-mRNT-nin ardıcıllığı dəyişilir, nəticədə, yetkin mRNT-nin ardıcıllığı onu genom DNT-də kodlaşdıran eqzonların ardıcıllığından fərqlənir.

RNT redaktəsi protozoanların və bitkilərin mitoxondrisində və xloroplastlarda geniş yayılmışdır. Bəzi patogen tripanosomaların mitoxondrisində bəzi mRNT-lərin ardıcıllığının yarısından çoxu müvafiq ilkin transkriptin ardıcıllığından fərqlənir. Spesifik sayda U-ların əlavə olunması və silinməsi, əsas-cütü əmələ gətirmiş qısa "bələdçi" RNT-lər tərəfindən təmin olunan templeyt üzrə gedir. Bu RNT-lər çox az sayda olan böyük DNT molekullarına bağlanmış olan minlərlə kiçik həlqəvi DNT molekulları tərəfindən kodlaşdırılır. Bu cürə protozoanlarda mitoxondrial zülalları kodlaşdırmaq üçün belə barok mexanizminin əsas səbəbi aydın deyil. Amma bu sistem, insan və ya digər sahib onurğalıların hüceyrələrində mövcud olmayan, mikroblarda vacib olan kompleks prosessinq fermentlərini ingibirləşdirmək üçün dərmanlar üçün potensial hədəfi təmin edir.

Ali eukariotlarda, RNT redaktə olunması çox nadir hallarda baş verir, bu vaxta qədər, yalnız tək bir-əsas dəyişməsi müşahidə olunmuşdur. Amma, bəzi hallarda belə kiçik redaktə olunma çox əhəmiyyətli funksional dəyişikliklərə səbəb olur. Məməlilərdə RNT redaktəsinin çox əhəmiyyətili nümunəsinə xolesterinin udulması və daşınmasında əsas rol oynayan qan zərdabı zülalının iki alternativ formasını kodlaşdıran *APOB* geni daxildir.



ŞƏKİL 10-21 *Drosophila Dscam* geni böyük miqdarda alternativ izoformalara splays olunur. *Dscam* neyronlarda hüceyrə-səth zülalının kodlaşdırır. Zülal (*aşağıda*) on müxtəlif immunoqlobulin (Ig) domenlərdən (oval), altı müxtəlif III tip fibronektin domenlərdən (düzbucaqlı), bir transmembran domendən (sarı) və C-sonluq sitoplazmatik domendən (tünd boz) təşkil olunmuşdur. Tam prosess olunmuş mRNT-lər hər biri bir eqzonu təmsil edən düzbucaqlı şəkilində və 5′ papağı təmsil edən yaşıl dairə şəkilində göstərilir. mRNT-lərin hər biri açıq mavi rəngdə (yuxarıda) göstərilmiş 12 Ig2 eqzonlardan birinə, yaşıl rəngdə göstərilmiş 48 Ig3 eqzonlardan birinə, tünd mavi rəngdə göstərilmiş 33 Ig7 eqzonlardan birinə və sarı rəngdə göstərilmiş iki transmembran eqzonlardan birinə malik olur. Bənövşəyi rəngdə göstərilmiş eqzonlar hər bir məlumata (burada mRNT) splays olunur. Beləliklə, alternativ splaysinq 12 × 48 × 33 × 2 = 38016 mümkün olan izoformanı yarada bilir. Bax M. R. Sawaya et al., 2008, *Cell* **134**:1007.



ŞƏKİL 10-22 *APOB* pre-mRNT-nin RNT redaktəsi. Qaraciyərdə istehsal olunan *APOB* mRNT əsas transkriptdə olan eqzonlarla eyni ardıcıllığa malikdir. Bu mRNT iki funksional domenə malik olan apoB-100 zülala translyasiya olunur: N-sonluqlu domen (yaşıl) lipidlərlə birləşmiş olur və C-sonluqlu domen (narıncı), hüceyrə membranında LDL reseptorlara birləşmiş olur. Bağırsaqda istehsal olunan *APOB* mRNT-sində eqzon 26-da CAA kodon UAA stop kodona redaktə olunur. Nəticədə, bağırsaq hüceyrələri, apoB-100-ün N-sonluqlu domeninə uyğun olan apoB-48 zülalı istehsal edir. Bax P. Hodges and J. Scott, 1992, *Trends Biochem. Sci*. **17**:77.

Nəticədə, o inkişaf etmiş dünyada ölüm hallarının əsas səbəblərindən biri olan arterial xəstəlik *ateroskleroza* aparan patogen proseslərdə çox mühümdür. *APOB* gen həm qaraciyərin əsas hüceyrə tipi hepatositlərdə qan zərdabı zülalı apolipozülal (apolipoprotein) B-100-ü (apoB-100) həm də bağırsaq epiteli hüceyrələrində ekspressiya olunan apoB-48-i ekspressiya edir. 240-kDa apoB-48 500kDa apoB-100-ün N-sonluqlu rayonuna uyğun gəlir. Fəsil 7-də ətraflı təsvir edildiyi kimi, hər iki apoB zülal qanda lipidlərin daşınmasını həyata keçirən çox böyük lipozülal komplekslərin komponentləridirlər. Amma, yalnız səthlərində apoB-100 zülalına malik olan aşağı-sıxlıqlı lipozülal (LDL) komplekslər bütün hüceyrələrdə mövcud olan LDL reseptorlara birləşməklə xolesterini bədən toxumalarına daşıyır (bax Şəkil 12-47 və 14-29).

ApoB-nin iki formasının hüceyrə-tipi-spesifik ekspressiyası, ApoB pro-mRNT-nin 6666-cı mövqedə ardıcıllığının C-dən U-ya dəyişilməsi ilə redaktə olunmasının nəticəsidir. Yalnız bağırsaq hüceyrələrində baş verən bu dəyişilmə CAA qlutamin kodonunu UAA stop kodona çevirir və nəticədə qısa apoB-48-in sintezinə səbəb olur (Şəkil 10-22). C_{6666}-dan U-a çevirən post-transkripsiya deaminləşməni (bax Şəkil 2-17) həyata keçirən qismən təmizlənmiş fermentlə aparılan tədqiqatlar göstərir ki, o, ApoB-nin əsas transkriptində C_{6666}-nı əhatə edən ardıcıllıqda 26 nukleotid qədər qısa RNT-ni tanıya və redaktə edə bilir.

10.2 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Pre-mRNT-nin Prosessinqinin Tənzimlənməsi

- Əsas transkriptlərin alternativ splaysinqinə, alternativ promotorların istifadə olunmasına və müxtəlid poli(A) saytlarında kəsilməyə görə, müxtəlif mRNT-lər müxtəlif hüceyrə tiplərində və ya inkişafın müxtəlif mərhələlərində eyni gendən ekspressiya oluna bilirlər (bax Şəkil 10-18).
- Alternativ splaysinq, tənzimlənən splays saytlar yaxınlığında spesifik ardıcıllıqlara birləşən RNT-birləşdirən zülallarla tənzimlənə bilir. Splaysinq repressorları, splaysinq faktorlarının pre-mRNT-də spesifik saytlara birləşməsini məkanca blok edə bilir və ya onarın fəaliyyətini ingibirləşdirə bilir. Splaysinq aktivatorları splaysinq faktorlarla qarşılıqlı əlaqəyə girərərk splaysinqi gücləndirirlər, beləliklə də onların tənzimlənən splays saytla birləşməsinə kömək edirlər. Splaysinq repressorları ilə birləşmiş RNT ardıcıllığı, onların intronda və ya eqzonda olmasından asılı olaraq intron və ya eqzon splaysinq saylenserləri adlandırılırlar. Splaysinq aktivatorları ilə birləşmiş RNT ardıcıllığı intron və ya eqzon splaysinq enhanserləri adlandırılır.
- RNT redaktəsi zamanı pre-mRNT-nin nukleotid ardıcıllığı nüvədə dəyişilir. Onurğalılarda, bu proses olduqca nadir hallarda baş verir və yalnız tək bir əsasın C-nin U-ya dəyişilmələri müşahidə olunmuşdur, amma dəyişilmələr redaktə olunmuş kodonla kodlaşdırılan amin turşusunun dəyişilməsi ilə çox əhəmiyyətli nəticələrə səbəb ola bilir (bax Şəkil 10-22).

10.3 mRNT-nin Nüvə Qabığından Daşınması

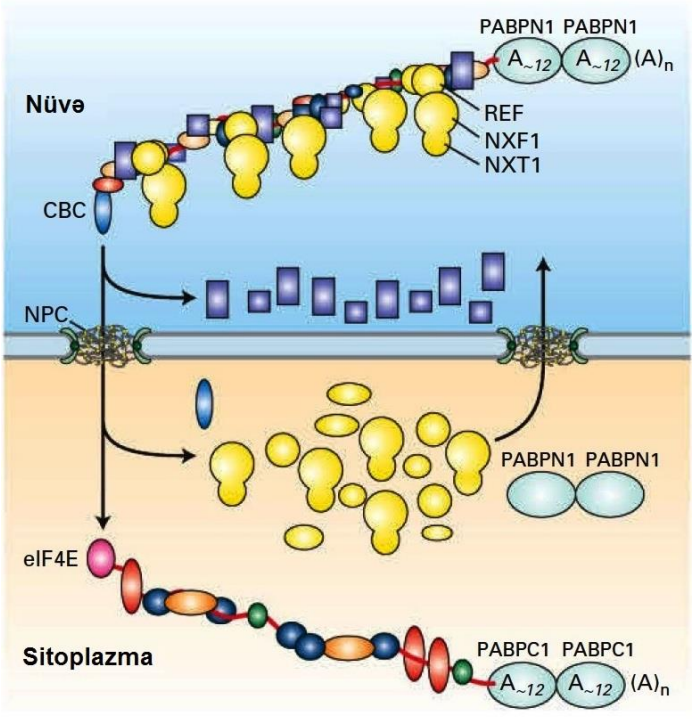
Nüvədə tam prosess olunmuş mRNT-lər ***nüvə mRNP-lər*** adlanan kompleks şəkilində hnRNP zülallarla birləşmiş vəziyyətdə olurlar. mRNT kodlaşdırdığı zülala translyasiya olunmazdan öncə o, nüvədən sitoplazmaya eksport olunmalıdır. Nüvə qabığı iki membran vərəqlərindən ibarət olub nüvəni sitoplazmadan ayırır (bax Şəkil 1-12). Hüceyrəni əhatə edən plazma membran kimi, hər bir nüvə membranı suyu dəf edən fosfolipid ikiqatlılarından və onlarla assosasiyada olan çoxsalı müxtəlif zülallardan təşkil olunub. mRNP-lər və başqa makromolekullar, o cümlədən tRNT-lər və ribosomal subvahidlər nüvədən ***nüvə məsamələri kompleksləri*** (**NPC**-lər) ilə nüvə örtüyünü kəsib keçirlər. Bu bölmədə diqqət mRNP-lərin nüvə məsamələrindən kəsib keçərək daşınmasına və bu prosesin tənzimlənməsini həyata keçirən mexanizmin izahına yönəlmişdir. mRNP-lərin, zülalların və başqa yüklərin NPC-lərdən keçərək daşınması Fəsil 13-də ətraflı müzakirə olunur.

Nüvə qabığına batan NPC-lər formaca silindirik olub diametri təxminən 30 nm bərabərdir. 40-60 kDa ölçüdən böyük olan zülallar və RNP-lər selektiv şəkildə onlara birləşən və NPC-nin mərkəzi kanalındakı komponentləri ilə ikitərəfli geriyədönən şəkildə qarşılıqlı əlaqədə olan transporter zülalların köməyi ilə nüvə qabığından keçərək daşınırlar. mRNP-lər NPC-lərdən **nüvə eksport faktoru 1** (**NXF1**) adlanan böyük subvahiddən və **nüvə eksport transporter 1** (**NXT1**) adlanan kiçik subvahiddən təşkil olunmuş heterodimer *mRNP eksporterlər* vasitəsilə daşınırlar. NXF1 RNT və RNP kompleksində olan digər zülallarla assosasiya edərək nüvə RNP-lərə birləşir. Bu zülalların ən əhəmiyyətli olanlarından biri, əvvəllər müzakirə olunmuş, hər bir eqzon-eqzon qovşağının 5′ sonluğuna birləşmiş, təxminən 20 nukleotiddən ibarət olan ardıcıllıqdan təşkil olunmuş (bax Şəkil 10-23) eqzon-qovşağı kompleksinin komponenti REF-dir (RNT eksport faktoru). mRNP eksporter həmçinin, eqzon splaysinq enhanserə birləşmiş SR zülallarla assosasiya girir. Beləliklə, SR zülallar eqzon funksiyası ilə assosasiya edərək həm mRNT-nin spalysinqində, həm də tam prosessinq olunmuş mRNT-nin NPC-dən keçərək sitoplazmaya daşınmasında birbaşa iştirak edir. mRNP-lər ehtimal ki, öz uzunluqları boyunca, NPC mərkəzi kanalını dolduran, quruluşu formalaşmamış zülal domenlərlə geriyə dönən şəkildə əlaqəyə girən çoxsaylı mRNP eksporterlərlə birləşirlər (bax Fəsil 13).

NPC-nin mərkəzi skafoltundan nukleoplazmaya tərəf uzanan zülal filamentlər *NPC nüvə səbətini* yaradır, (bax Şəkil 10-23). Başqa zülal filamentlər NPC-nin sitoplazmatik üzündən sitoplazmanın daxilinə tərəf uzanırlar. Bu filamentlərin hər iki tərəfi mRNP eksportuna kömək edir. NXF1 və nüvə səbətindəki zülalla geriyə dönən şəkildə birləşən adaptor zülalı olan Gle2 nüvədə mRNP-ni NPC-yə yaxınlaşdıraraq onu eksport üçün hazırlayır. NPC-nın sitoplazma filamentlərindəki zülal RNT helikaza (**Dbp**5) ilə birləşir, o isə öz növbəsində, sitoplazmaya çatarkən mRNP-dən NXF1/NXT1 və digər hnRNP zülalların dissosasiyasının həyata keçirilməsində fəaliyyət göstərir.

mRNP remodelinq adlandırılan prosesdə, nüvə mRNP kompleksində mRNT ilə assosasiyada olan zülallar, mRNP NPC-dən keçərək daşındığı zaman müxtəlif zülallar dəsti ilə dəyişilirlər (Şəkil 10-23). Bəzi nüvə mRNP zülalları daşınmanın əvvəlində dissosasiya edərək nüvədə qalır və yeni sintez

olunmuş pre-mRNT-yə birləşirlər. Digər nüvə mRNP zülalları mRNP kompleksinin NPC-də hərəkəti zamanı onunla birləşmiş vəziyyətdə qalırlar və sitoplazmaya çatana qədər mRNP-dən dissosasiya etmirlər. Bu kateqoriyadan olan zülallara NXF1/NXT1 mRNP eksporter, 5′ papağa birləşmiş *papaq-birləşdirən-kompleks* (*cap binding cpomplex - CBC*) və poli(A) quyruğa birləşmiş PABPN1 zülalları daxildir. Bu zülallar, NPC-nin sitoplazmatik tərəfində, yuxarıda qeyd olunduğu kimi, sitoplazmatik NPC filamentlə birləşmiş olan Dbp5 RNT helikazanın təsiri ilə mRNP-dən dissosasiya edirlər. Sonra bu zülallar, Fəsil 13-də başqa nüvə zülalları üçün müzakirə olunduğu kimi, geriyə, nüvəyə daşınırlar və burada onlar başqa mRNP-lərin eksportunda iştirak edə bilirlər. Sitoplazmada papağa-birləşən translyasiyanın inisiasiyası faktoru eIF4E nüvə mRNP-də 5′ papğa birləşmiş CBC-nı əvəz edir (bax Şəkil 5-23). Onurğalılarda nüvə poli(A)-birləşən zülal PABPN1 sitoplazmatik poli(A)-birləşən zülal PABPC1 (bu nüvə PABPN1-dən fərqləndirmək üçün belə adlandırılmışdır) ilə əvəz olunur. Tumurcuqlayan maya hüceyrələrində həm nüvə həm də sitoplazma üçün birlikdə yalnız bir PABP tapılmışdır.



Şəkil 10-23 mRNP-lərin nüvədən eksportu zamanı remodelinqi. Bəzi mRNP zülallar (düzbucaqlılar) nüvə mRNP-lərdən NPC ilə eksport olunmamışdan öncə dissosasiya edirlər. Digərləri isə (oval) mRNP ilə asosassiya olunmuş şəkildə NPC yolu ilə eksport olunurlar, amma sitoplazmada ondan dissosasiya olunaraq NPC yolu ilə geriyə, nüvəyə daşınırlar. Sitoplazmada, translyasiyanın inisiasiyası faktoru eIF4E 5′ papağa birləşmiş CBC-ni, PABPC1 isə PABPN1-i əvəz edir.

SR Zülalların Fosforlaşması və Defosforlaşması mRNP-nin Nüvə Məsamələri Komleksindən Keçərək Eksportunun İstiqamətini Təmin Edir

S. cerevisiae tədqiqatları göstərir ki, mRNP-nin nüvədən sitoplazmaya eksportunun istiqaməti NXF1/NXT1 eksporterin mRNP-lərə birləşməsinə kömək edən REF kimi mRNP adaptor zülalların fosforlaşması və defosforlaşması ilə nəzarət olunur. Bir halda, mayanın SR zülalı (Npl3), maya mRNP eksporterin birləşməsinə kömək edən adaptor kimi fəaliyyət göstərir (Şəkil 10-24). SR zülalı özünün fosforlaşmış formasında ilkin olaraq yeni sintez olunmuş mRNT-yə birləşir. 3′ sonluqda kəsilmə və poliadenilləşmə qurtardıqdan sonra, adaptor zülalı xüsusi nüvə zülalı fosfatazası ilə defosforlaşır, bu da mRNP eksportu üçün əhəmiyyətlidir. Yalnız defosforlaşmış adaptor zülalı mRNP eksporterə birləşə bilir, bununla da o, mRNP-nin eksportunu düzgün poliadenilləşmə ilə bağlayır. Bu mexanizm mRNT-nin "keyfiyyət nəzarəti" formalarından biridir. Əgər yeni sintez olunmuş mRNP düzgün prossesinq olunmamışdırsa o, Npl3-ü defosforlaşdıran fosfataza tərəfindən tanınmır, bu səbəbdən, mRNP eksporter ilə birləşmir və nüvəfən kənara eksport oluna bilmir. Əvəzində, o, nüvədə və sitoplazmada müdafiə olunmayan RNT-ləri dağıdan çoxzülallı kompleks eqzozomlar vasitəsi ilə dağıdılır (bax Şəkil 10-1 və 10-16).

Eksportun ardınca sitoplazmada Npl3 SR zülal xüsusi sitoplazma proteinkinazası ilə fosforlaşır. Bu fosforlaşma onun mRNP eksporter ilə birlikdə mRNP-dən dissosasiyasına səbəb olur. Bu yolla, RNT prosessinqi başa çatdıqdan sonra mRNP adaptor zülalların nüvədə defosforlaşması və onların sitoplazmada fosforlaşması, nəticədə baş verən dissosasiyası, onların formalaşdığı nüvədə mRNP eksporter-mRNP komplekslərinin yüksək qatılığının yaranmasına, onların dissosasiya etdikləri sitoplazmada isə bu komplekslərin qatılığının aşağı olmasına səbəb olur. Nəticədə, mRNP eksportun istiqaməti sadə diffuziya yolu ilə transport üçün lazım olan mRNP eksporter-mRNP kompleksin qatılığının NPC boyunca daha yüksək olan nüvədən daha aşağı olan sitoplazmaya doğru azalan istiqamətdə aparılır.

Həşarat Süfrəsinin Tüpürcək Vəzlərində Balbiani Halqa mRNP-lərin NPC-lərlə Eksportunun Birbaşa Vizuallaşmasına İmkan Verir

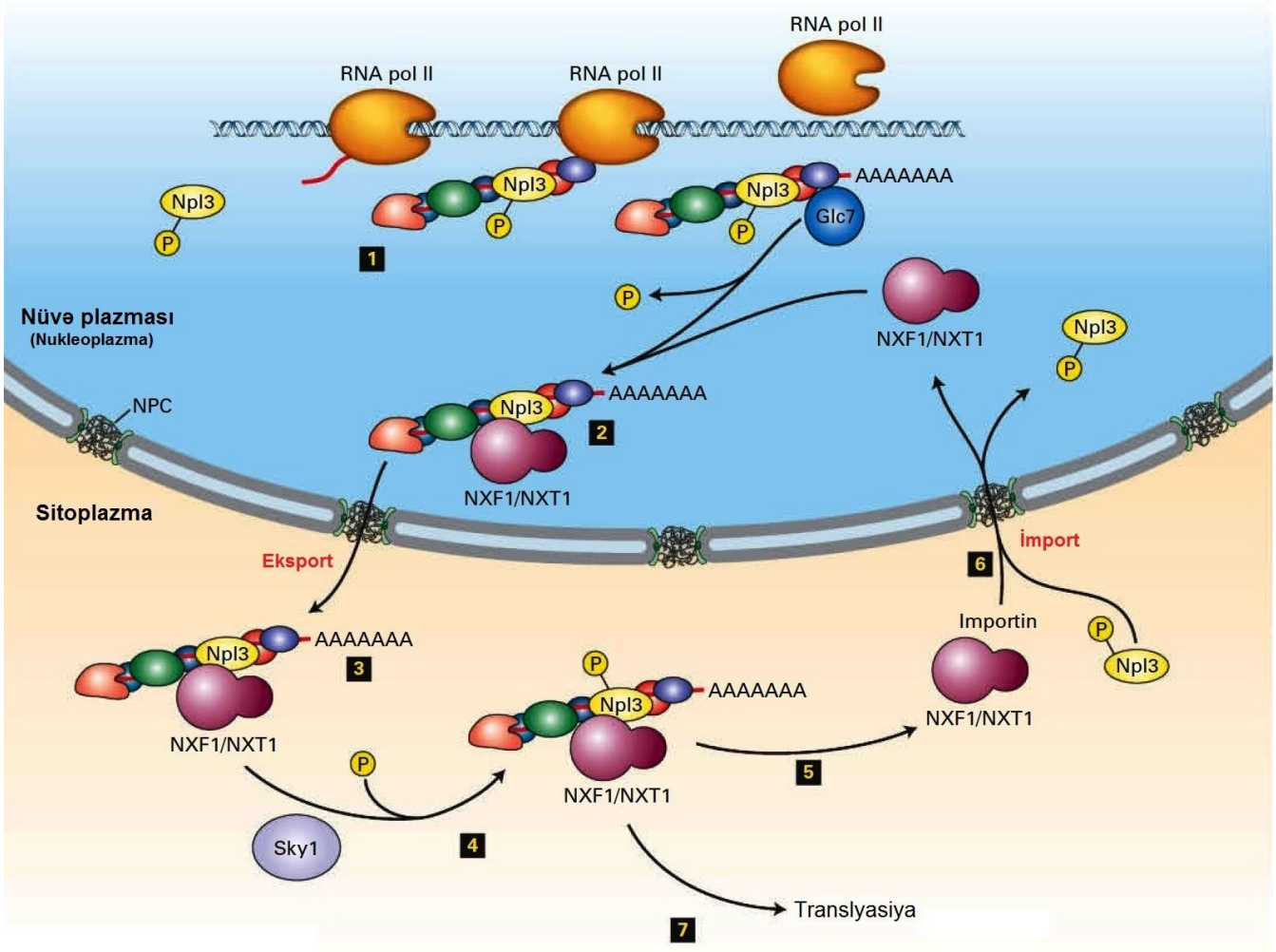
Chironomous tentans həşaratının süfrəsinin tüpürcək vəzləri hnRNP-lərin formalaşmasının və NPC-lərlə eksportunun elektron mikroskopiya tədqiqatları üçün çox yaxşı model sistemidir. Bu süfrələrdə böyük xromosom qabarmalarında Balbiani halqaları adlanan genlər, hnRNP zülallarla assosasiya yaradan külli miqdarda yeni sintez olunan pre-mRNT-lərə transkripsiya olunurlar və sonda uzunluğu ~75 kə olan mRNT ilə spirallaşmış mRNP-lərə prosess olunurlar (Şəkil 10-25a, b). Bu nəhəng mRNT-lər, inkişaf etməkdə olan süfrələri yarpağa yapışdıran böyük yapışqan zülalları kodlaşdırırlar. Balbiani halqa hnRNP-lərdə pre-mRNT-nin prosessinqindən sonra alınan mRNT-lər NPC-lərdən keçərək sitoplazmaya daşınırlar. Bu hüceyrələrin kəsiklərinin elektron mikrofotosu, nüvə məsamələrindən kəsib keçərkən spiralı açılmış şəkildə olan mRNP-ləri və sitoplazmaya daxil olan kimi onların ribosomlara birləşmələrini göstərir. Spiralın belə açılması yəqin ki, sitoplazmatik kinazalar vasitəsi ilə mRNP zülalların fosforlaşmasının nəticəsi kimi mRNP-lərin remodelinqinin və əvvəlki bölmədə müzakirə olunduğu kimi, NPC sitoplazmatik filamentlərlə assosasiyada olan RNT helikazaların fəaliyyətinin

nəticəsidir. Daşınma zamanı mRNP-lərin ribosomlarla birləşməsinin müşahidə olunması göstərir ki, 5′ sonluq NPC-lərdən keçən aparıcı ucdur. Balbiani halqa mRNP-lərin nüvə məsamələri kompleksindən daşınmasının dəqiq izahı elektron mikrofotosu Şəkil 10-25c-də verilmiş modelin yaranmasına səbəb oldu.

Splaysosomlarda pre-mRNT-lər Nüvədən Eksport Olunmurlar

Çox əhəmiyyətlidir ki, yalnız tam prosess olunmuş yetkin mRNT nüvədən eksport olunur, çünki intronlara malik olan tam prosess olunmamış mRNT translyasiya zamanı, hüceyrənin fəaliyyətinə mane ola bilən qüsurlu zülalı istehsal edərdi. Buna mane olmaq üçün, bir qayda olaraq splaysesomlarda snRNP-lərlə assosasiya edən pre-mRNT-lərin sitoplazmaya daşınmasına mane olunur.

Bu məhdudiyyəti nümayiş etdirən bir tip eksperimentdə, normal halda splays olunan bir introna malik olan pre-mRNT-ni kodlaşdıran gen, konsensus splays-sayt ardıcıllıqlarından yayınmağın mümkün olması üçün mutasiya olunur. İntronun uclarında 5′ və ya 3′ uclardan birinin invariant splays-sayt əsaslarının mutasiya olunması pre-mRNT-lərin snRNP-lərlə birləşərək splaysesomları yaratması ilə nəticələnir, amma RNT splaysinqi blok olunduğundan pre-mRNT nüvədə qalmış olur. Əksinə, eyni pre-mRNT-də 5′ və 3′ splays-saytların hər ikisinin mutasiya olunması splays olunmamış pre-mRNT-nin eksport olunması ilə nəticələnir, hərçənd ki, böyük ehtimalla eqzon-qovşaq kompleksinin olmamasına görə bu splays olunmuşlarla müqayisədə daha az səmərəli şəkildə baş verir. Hər iki splays sayt mutasiya olunanda pre-mRNT-lər snRNP-lərlə səmərəli şəkildə birləşmir, ona görə də onların daşınması blok oluna bilmir.

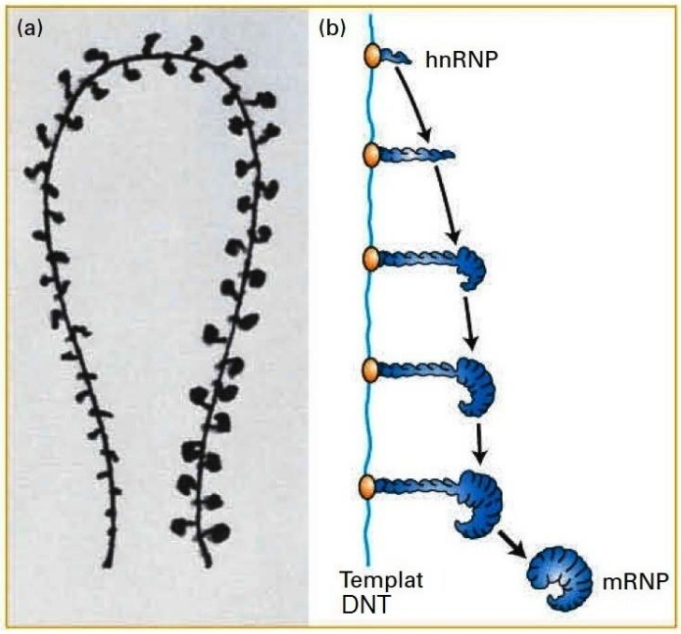


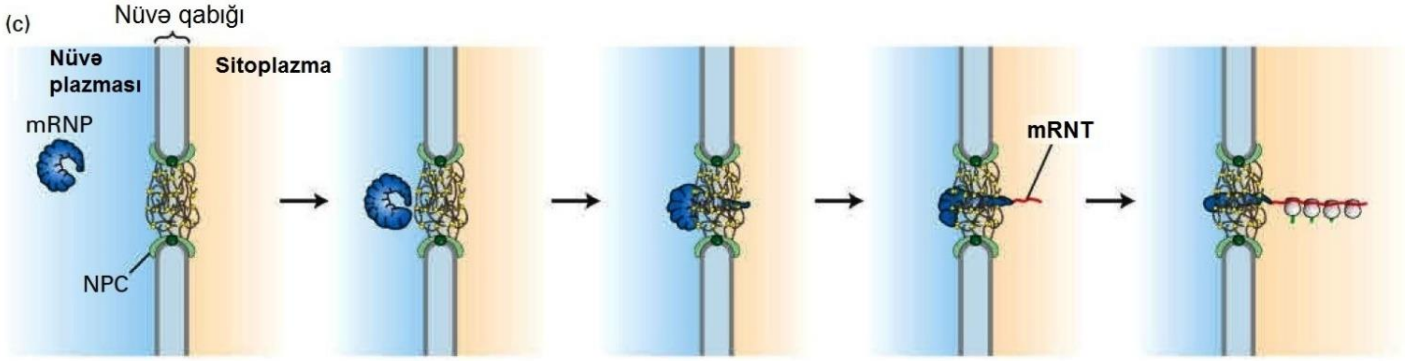
ŞƏKİL 10-24 mRNP nüvə eksportunun geriyə dönən fosforlaşması və yönəldilməsi. Pillə 1: maya SR zülalı Npl3 fosforlaşmış formada yeni sintez olunan pre-mRNT-lərlə birləşir. Pillə 2: Poliadenilləşmə uğurlu şəkildə baş verdikdə, mRNP eksportu üçün əhəmiyyətli olan Glc7 nüvə fosfatazası Npl3-ü defosforlaşdırır və mRNP ekporter NXF1/NXT1-in birləşməsini təşviq edir. Pillə 3: mRNP eksporter mRNP kompleksinin nüvə məsaməsi kompleksinin (NPC) mərkəzi kanalından diffuziyasına imkan verir. Pillə 4: Sitoplazmatik proteinkinaza Sky1 sitoplazmada Npl3-ü fosforlaşdırır, ehtimal ki, NPC sitoplazmatik filamentlə assosasiya edən (pillə 6) RNT helikazaların təsiri ilə fosforlaşmış Npl3-ün mRNP eksporterdən dissosasiyasına (pillə 5) səbəb olur. mRNT transporter və fosforlaşmış

Npl3 NPC-lərlə geriyə nüvəyə daşınırlar. Pillə 7 Daşınan mRNT sitoplazmada translyasiya olunmaq üçün hazırdır. Bax E. Izaurralde, 2004, *Nat.Str.Mol.Biol*. **11**:210-212; həmçinin bax W. Gilbert and C. Guthrie, 2004, *Mol.Cell* **13**:201-212

Mayada aparılan tədqiqatlar göstərdi ki, NPC nüvə səbətinin zülal komponentləri, pre-mRNT-lərin nüvədə snRNP-lərlə birləşmiş vəziyyətdə olmasını tələb edir. Əgər bu zülal və ya onun birləşdiyi nüvə səbəti zülalı məhv edilərsə, splays olunmamış pre-mRNT-lər eksport olunacaqdır. Nəticə etibarı ilə, bu zülallar snRNP-lərlə assosasiya edən hnRNP-lərin NPC-lərdən keçməsinə mane olacaqdır.

Qlobin zülalların anormal dərəcədə aşağı səviyyəsi nəticəsində yaranan, irsən keçən talassemiya xəstəliyinin bir çox halları qlobin-genin splays saytlarında baş verən, splaysinqin effektivliyini aşağı salan, amma pre-mRNT-lərin snRNP-lərlə assosasiyasına mane olmayan mutasiyaların nəticəsidir. Nəticədə əmələ gələn splays olunmamış qlobin pre-mRNT-lər eritroid progenitorların (törədici) nüvəsində qalır (bax Şəkil 16-7) və sürətlə parçalanır.





ŞƏKİL 10-25 Heterogen ribonukleoprotein (hnRNP) kompleksin formalaşması və mRNT-lərin nüvədən eksport olunması. (a) *Chironomus tentans*-da tək xromatin transkripsiya ilgəyinin modeli və Balbani halqası (BR) mRNP-nin toplanması. Templeyt DNT-dən istehsal edilən yei sintez olunan RNT transkriptlər sürətlə zülallarla birləşərək hnRNP-ləri əmələ gətirirlər. hnRNP-nin ölçüsünün tədricən artması RNT transkriptin uzunluğunun transkripsiyanın start saytından böyük məsafədə artmasını əks etdirir. Model, tüpürcək vəz hüceyrələrindən hazırlanmış serial nazik kəsiklərin elektron mikrofotosu əsasında yaradılmışdır. (b) hnRNP-lərin biogenezinin sxematik diaqramı. Pre-mRNT-nin prosessinqinin ardınca, əmələ gələn ribonukleozülal zərrəcik mRNP adlanır. (c) BR mRNP-lərin, elektron mikroskopiya tədqiqatlarına əsaslanan nüvə məsamələri kompleksindən (NPC) daşınması modeli. Qeyd edək ki, əyilmiş mRNP-lər NPC-lərdən keçərkən spiralları açılır. mRNT-lər sitoplazmaya daxil olan kimi, o surətlə ribosomlarla birləşir, bu göstərir ki, NPC-lərdən birinci onların 5′ sonluğu keçir. (b) və (c) hissələrinə bax B. Daneholt, 1997, *Cell* **88**:585; həmçinin bax B. Daneholt, 2001, *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* **98**:7012. [(a) hissəsi Elsevier razılığı ilə Erricson, C. et al., "The ultrastructure of upstream and downstream regions of an active Balbiani ring gene," *Cell*, 1989, **56**(4): 631–9-dan yenidən çap olunur; nəzakətlə B. Daneholt. Razılıq Copyright Clearance Center, Inc vasitəsilə alınmışdır.]

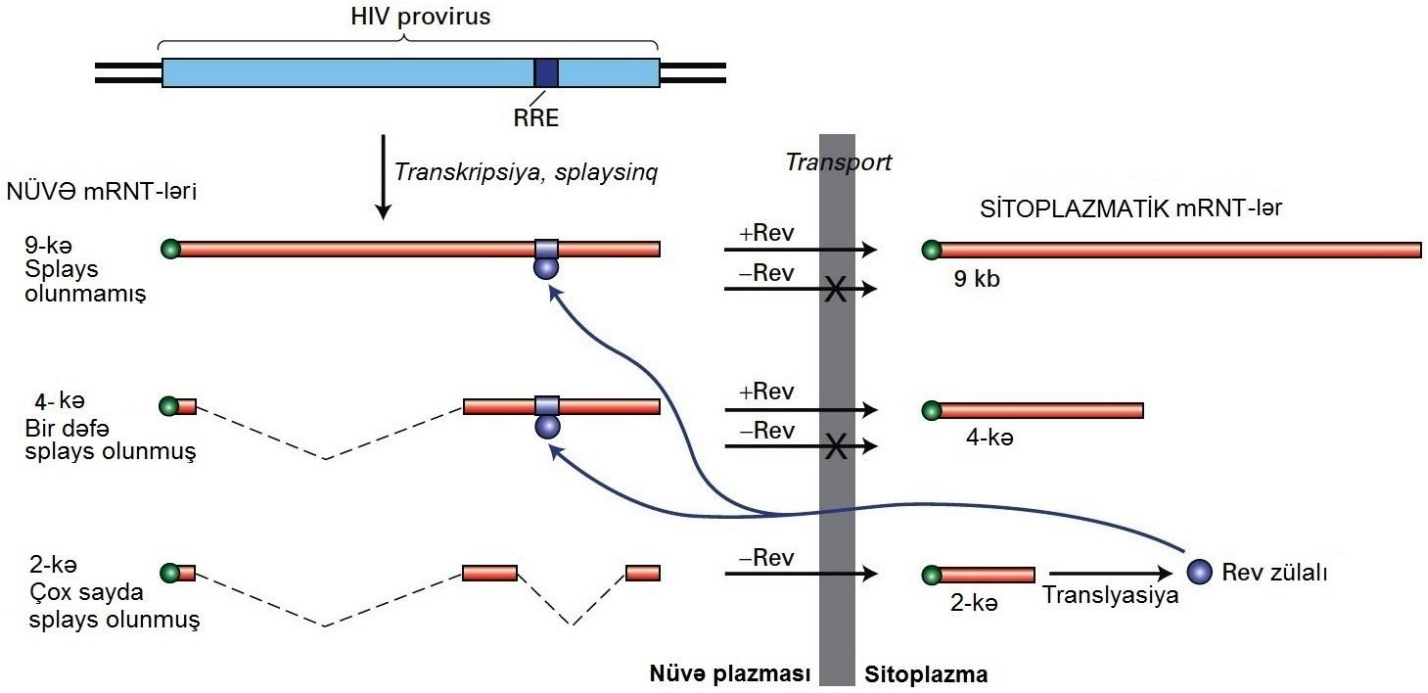
HIV Rev Zülalı Splays Olunmamış Virus mRNT-lərin Daşınmasını Tənzimləyir

Əvəllər müzakirə olunduğu kimi, yetişmiş funksional mRNT-lərə malik olan mRNP-lərin nüvədən sitoplazmaya daşınması gen ekspressiyası üçün kritik əhəmiyyət kəsb edən kompleks mexanizmlə baş verir (bax Şəkillər 10-23, 10-24 və 10-25). Bu daşınmanın tənzimlənməsi nəzəri olaraq gen nəzarətinin başqa vasitəsi ola bilərdi, hərçənd ki, bu nisbətən seyrək hallarda baş verir. Həqiqətən də, tənzimlənən mRNT eksportunun məlum olan yeganə nümunəsi, hüceyrə zülallarının denaturasiyasına səbəb olan şəraitə (məsələn, istilik şoku) qarşı cavab reaksiyaları zamanı və ya virus yoluxmaları zamanı nüvə eksportunda virusla-induksiya olunan dəyişilmə virus replikasiyasını maksimuma çatdırdığı zaman meydana gəlir. Burada biz mRNP eksportunun, insanın immun çatışmazlığı virusunun (HIV) kodlaşdırdığı zülal vasitəsi ilə tənzimlənməsini təsvir edirik.

Retrovirus HIV öz RNT genomunun DNT nüsxəsini sahib hüceyrənin DNT-nə inteqrasiya edir (bax Şəkil 5-48). İnteqrasiya etmiş virus DNT-si və ya provirus, hüceyrənin RNT polimeraza II-si vasistəsi ilə bir transkriptə transkripsiya olunan tək transkripsiya vahidinə malikdir. HIV transkript alternativ yollarla splays olunaraq üç sinif mRNT-ni yarada bilir: 9-kə splays olunmamış mRNT; intronun çıxarılması ilə splays olunmuş 4-kə mRNT-lər; iki və daha artıq intronun çıxarılması ilə yaranan 2-kə mRNT-lər (Şəkil 10-26). Sahib hüceyrənin nüvəsində onların sintezindən sonra bütün üç sinif HIV mRNT-lər sitoplazmaya daşınır və virus zülallarına translyasiya olunurlar; 9-kə splays olunmamış RNT-lərin bəziləri, hüceyrə səthindən tumurcuqlayaraq ayrılan gələcək nəsil virion üçün virus genomu kimi istifadə olunur.

9-kə və 4-kə HIV mRNT-lər splays saytlarına malik olduqlarından onlara natamam splays olunmuş mRNT-lər kimi baxmaq olar. Əvəllər müzakirə olunduğu kimi, bu cürə tam splays olunmamış mRNT-lərin splaysesomlarda snRNP-lərlə assosasiyası normal halda onların nüvədən daşınmasının qarşısını alır. Beləliklə, HIV və eləcə də digər retroviruslar bu blokolunmaya qarşı, uzun virus mRNT-lərinin eksportuna imkan verən müəyyən mexanizmə malikdirlər. Bəzi retroviruslar öz genomları daxilində yüksək afinliklə NXF1/NXT1 mRNP eksporterə birləşmiş *konstitutiv transport elemenləri* (*CTE*) adlanan RNT ardıcıllığı yaratmışlar. mRNP eksporteri belə möhkəm qarşılıqlı əlaqə, splays olunmamış retrovirus RNT-nin sitoplazmaya daşınmasına imkan yaradır. HIV bu problemi başqa cürə həll edir.

HIV mutasiyaları ilə aparılan tədqiqatlar göstərdi ki, 9-kə splays olunmamış və 4-kə bir dəfə splays olunmuş virus mRNT-lərinin nüvədən sitoplazmaya daşınması virusla kodlaşdırılan Rev zülalını tələb edir. Sonrakı biokimyəvi eksperimentlər göstərdilər ki, Rev HIV RNT-lərində mövcud olan xüsusi Rev-cavab elementlərinə (RRE) birləşir. RRE olmayan HIV mutantları ilə yoluxmuş hüceyrələrdə splays olunmamış və bir dəfə splays olunmuş virus mRNT-ləri nüvədə qalırlar, bu da göstərir ki, nüvə eksportunun Rev-vasitəsilə stimullaşması üçün RRE tələb olunur. Yoluxmanın erkən dövründə, hər hansı Rev zülalının sintezindən əvvəl yalnız heç bir splays saytı qalmayan multi-splays olunmuş 2-kə mRNT-lər eksport oluna bilirlər. Bu alternativ splays olunmuş 2-kə mRNT-lərdən biri NXF1/NXT1 mRNT eksporterlə deyil, eksportin 1 transporteri ilə qarşılıqlı əlaqə yarada bilən, leysinlə-zəngin nüvə eksport siqnalına malik olan Rev zülalını kodlaşdırır (bax Fəsil 13). Rev zülalın sitoplazmada translyasiya olunmasının ardınca onun nüvəyə daşınması, çox böyük splays olunmamış və bir dəfə splays olunmuş HIV mRNT-lərin nüvə məsamələri kompleksindən keçərək eksport olunması ilə nəticələnir.



ŞƏKİL 10-26 HIV mRNT-lərin nüvədən sitoplazmaya daşınması. Bir neçə kodlaşdırıcı rayona malik olan HIV genomu tək bir 9-kə ilkin transkriptə transkripsiya olunur. Bir sıra 4-kə mRNT-lər bir neçə intronun istənilən hər hansı birinin alternativ splaysinq olunub çıxması nəticəsində yaranır (qırıq xətlərlə) və bir neçə 2-kə mRNT-lər iki və daha artıq alternativ intronun splays olunaraq çıxması ilə yaranır. Sitoplazmaya daşındıqdan sonra, bu müxtəlif RNT növləri müxtəlif virus zülallarına translyasiya olunurlar. 2-kə mRNT ilə kodlaşdırılan Rev zülalı, spalys olunmamış və bir dəfə splays olunmuş mRNT-lərdə Rev-cavab elementi (RRE) ilə qarşılıqlı əlaqəyə girir və onların sitoplazmaya daşınmasını stimullaşdırır. Bax B.R. Gullen and M.H. Malim, 1991, *Trends Biochem.Sci*. **16**:346.

10.3 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSİYALARI

mRNT-nin Nüvə Qabığından Daşınması

- mRNP-lərin əksəriyyəti, nüvə məsamələri kompleksinin (NPC) mərkəzi kanalını dolduran quruluşsuz zülal domenləri ilə qarşılıqlı əlaqə yaradan heterodimer mRNP eksporterlər

vasitəsi ilə nüvədən eksport olunur. Daşınmanın istiqaməti (nüvədən sitoplazmaya), sitoplazmada mRNP adaptor zülalların sitoplazmatik kinazalarla fosforlaşması ilə və nüvə məsamələri komplekslərinin sitoplazmatik filamentləri ilə assosasiyada olan RNT helikazaların fəaliyyəti ilə mRNP-nin eksporter-mRNP kompleksindən dissosasiyası nəticəsində yaranır. Nəticədə, mRNP eksporter-mRNP kompleksləri qatılıq qradientinin azalması istiqamətində NPC-də nüvədən sitoplazmaya diffuziya edir.

- mRNP eksporter mRNT-lərin əksəriyyətinə eqzon splaysinq enhanserə birləşmiş SR zülallarla və eqzon-qovşağı kompleksi ilə assosasiyada olan REF ilə və eləcə də əlavə mRNP zülalları ilə kooperativ birləşir.
- Normal halda splaysesomlara birləşmiş pre-mRNT-lər nüvədən eksport olunmurlar, translyasiya olunmaq üçün sitoplazmaya yalnız tam prosess olunmuş, funksional mRNT-lərin keçməsini təmin edirlər.

10.4 Post-transkripsiya Nəzarətinin Sitoplazmatik Mexanizmləri

Davam etməzdən öncə, nəzarətin tətbiq olunduğu gen ekspressiyasının pillələrini tez nəzərdən keçirək. Biz Fəsil 9-da gördük ki, transkripsiyanın inisiasiyasının və transkripsiyanın elonqasiyasının promotor-proksimal rayonda tənzimlənməsi, DNT→RNT→zülal gen ekspressiyası yolunda genlərin ekspressiyasının nəzarət olunmasının ilkin mexanizmlərdir. Bu fəsilin əvvəlki bölmələrində biz öyrəndik ki, zülal izoformalarının ekspressiyası alternativ RNT splaysinqinin tənzimlənməsi və poli(A) saytlarında kəsilmə və poliadenilləşmənin tənzimlənməsi ilə nəzarət olunur. Baxmayaraq ki, tam və düzgün prosess olunmuş mRNP-lərin nüvədən sitoplazmaya eksportu nadir hallarda tənzimlənir, düzgün prosess olunmayan və ya aberrant (azğın) modelləşmiş pre-mRNP-lərə mane olunur və belə qeyri anormal transkriptlər eqzosomlar tərəfindən parçalanır. Amma, retroviruslar, o cümlədən HIV, splays saytlarını saxlayan pre-mRNT-lərin eksport və translyasiya olunmasına imkan verən mexanizmləri yaradıb inkişaf etdirmişlər.

Bu bölmədə biz, çox genlərin ekspressiyasının təmzimlənmsini həyata keçirən post-transkripsiya nəzarətinin başqa mexanizmlərinə baxacağıq. Bu mexanizmlərin əksəriyyəti sitoplazmada fəaliyyət göstərir və mRNT-nin stabilliyinə və ya lokalizasiyasına, və yaxud onun zülala translyasiyasına nəzarət edir. Sitoplazmada mRNT-nin qatılığı onun sintezi sürəti ilə və parçalanması sürəti ilə təyin edilir. Böyük miqdarda tələb olunan zülalı (məsələn ribosomal zülalları) kodlaşdıran ən stabil mRNT-lər hər bir hüceyrə üzrə çox böyük sayda nüsxələrdə toplana bilirlər. Əksinə, qısa sıçrayışlarla ekspressiya olunan zülalları (məsələn, sitokinləri, immun cavabını tənzimləyən ifraz olunan zülalları) kodlaşdıran yüksək dərəcədə qeyri stabil olan mRNT-lər, hətta nüvədə yüksək sürətlə transkripsiya olunanda, prosessinq olunanda və nüvədən eksport olunanda belə, nadir hallarda bu cürə yüksək qatılığa çata bilirlər. Biz mRNT-ləri parçalayan əsas yolların müzakirəsi ilə başlayırıq.

Sonra biz, bir birinə çox yaxın olan, eksperimental və terapevtik məqsədlə spesifik genlərdə gen ekspressiyasının manipulyasiyası üçün çox güclü yeni metodlar olan gen nəzarətinin iki mexanizminin müzakirəsi ilə başlayırıq. Bu mexanizmlərə qısa (~22 nukleotid), **mikro RNT-lər** (**miRNT-lər**) və **qısa müdaxilə RNT-ləri** (**siRNT-lər**) adlanan bir-zəncirli RNT-lərlə nəzarət olunur. Bunların hər ikisi spesifik hədəf mRNT-lərlə əsas cütü əmələ gətirərək, ya onların sürətlə parçalanmasına (siRNT-lər), ya da translyasiyasının ingibirləşməsinə səbəb olurlar və yavaş parçalanmanı induksiya edirlər (miRNT-lər). Çox miRNT-lər birdən artıq mRNT-ni hədəf edə bilirlər. Nəticədə, bu mexanizmlər gen ekspressiyasının tənzimlənməsinə əhəmiyyətli dərəcədə kömək edir. RNT müdaxiləsi adlanan prosesə daxil olan qısa müdaxilə RNT-ləri (siRNT-lər) də həmçinin hüceyrənin virus yoluxmalarına qarşı və transpozonlarla həddən artıq yerdəyişmələrə qarşı əhəmiyyətli müdafiəsidir. Biz həmçinin zülalların sintezinin ümumi sürətinə nəzarət edən mexanizmi, eləcə də translyasiyanı və xüsusi mRNT-lərin stabilliyini tənzimləyən yüksək spesifikli mexanizmləri müzakirə edirik. Sonda, asimmetrik hüceyrələrin sitoplazmasında mRNT-lərin lokalizasiyasını tənzimləyən mexanizmləri müzakirə edirik, belə ki, kodlaşdırılan zülal hüceyrədə onun lazım olduğu yerlərdə translyasiya olunur.

Sitoplazmada mRNT-lərin Parçalanması Bir Sıra Mexanizmlərlə Baş Verir

Yuxarıda qeyd edildiyi kimi, mRNT-nin qatılığı onun sintezi sürətinin və parçalanması sürətinin fəaliyyətidir. Bu səbəbdən, əgər iki gen eyni sürətlə transkripsiya olunarsa, o zaman daha stabil olan müvafiq mRNT-nin sabit-vəziyyətdə qatılığı digərinin qatılığından daha yüksək olacaq. mRNT-nin stabilliyi həmçinin kodlaşdırılan zülalın sintezinin hansı tezliklə dayandırılmasını təyin edir. Davamlı mRNT üçün, kodlaşdırılan zülalın sintezi genin transkripsiyası dayandırıldıqdan sonra da uzun müddət inadla davam edir. Bakterial mRNT-lərin əksəriyyəti qeyri sabitdir və yarımparçalanma dövrü bir neçə dəqiqə olmaqla eksponensial olaraq parçalanır. Bu səbəbdən, bakterial hüceyrələr hüceyrə mühütində dəyişikliklərə uyğunlaşmaq üçün zülalların sintezini çox tez nizamlaya bilirlər. Digər tərəfdən, çoxhüceyrəli orqanizmlərdə hüceyrələrin əksəriyyəti kifayət qədər sabit mühütdə mövcud olur və günlər müddətindən aylara qədər və ya hətta orqanizmin bütün həyatı dövründə mövcud olub (məsələn sinir hüceyrələri) xüsusi funksiyaları yerinə yetirirlər. Müvafiq olaraq, ali eukariotlarda mRNT-lərin əksəriyyətinin yarım-yaşama dövrü saatlarla və ya daha çox olur.

Amma, eukariot hüceyrələrdə bəzi zülallar yalnız qısa zaman müddətində tələb olunur, ona görə də kəskin sıçrayışlarla ekspressiya olunmalıdırlar. Məsələn, yuxarıda müzakirə olunduğu kimi, məməlilərdə immun sisteminə daxil olan, **sitokinlər** adlanan müəyyən siqnal molekulları qısa sıçrayışlarla sintez olunub ifraz olunurlar (bax Fəsil 23). Buna oxşar olaraq, hüceyrə tsiklinin S fazasının başlanğıcını tənzimləyən transkripsiya faktorlarının çoxu, o cümlədən Fos və Jun qısa dövr müddətində sintez olunurlar (bax Fəsil 19). Belə zülalların ekspressiyası qısa sıçrayışlarla baş verir, çünki onların genlərinin transkripsiyası tez bir şəkildə işə salına və dayandırıla bilir və onların mRNT-ləri qeyri adi dərəcədə qısa, 30 dəqiqə və ya daha az yarım-yaşama dövrünə malikdirlər.

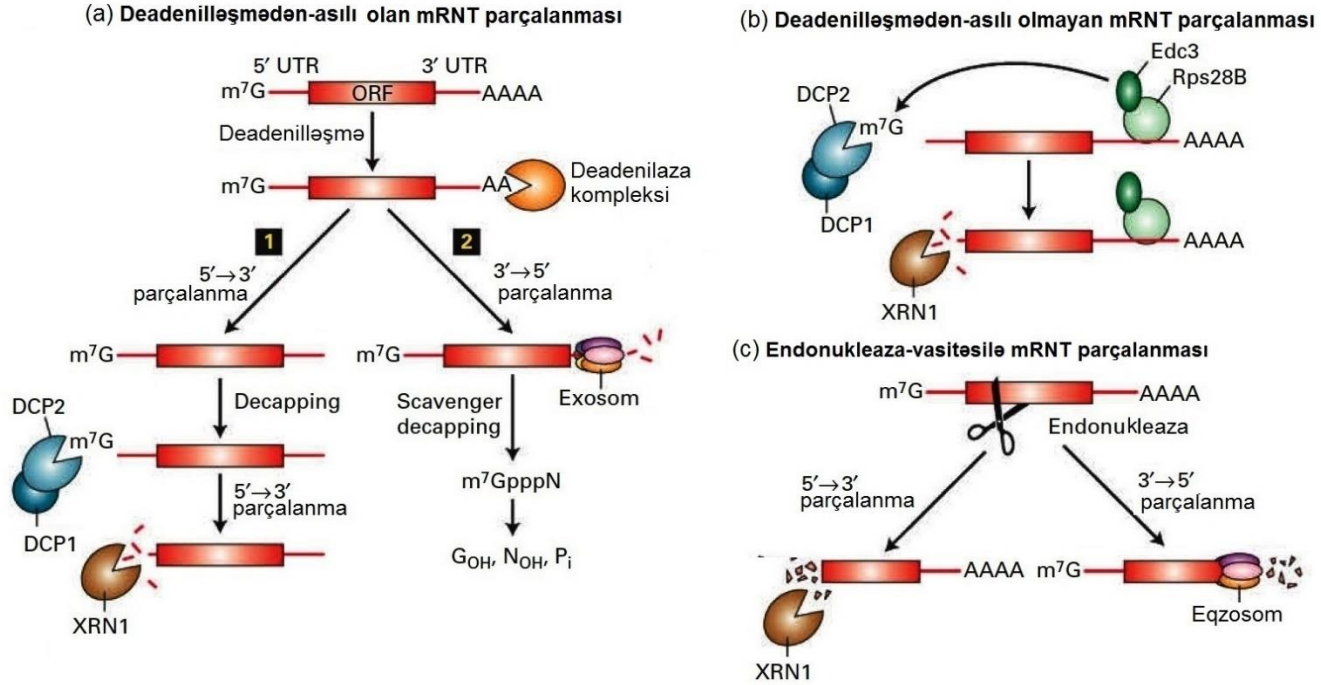
Sitoplazmatik mRNT-lər, Şəkil 10-27-də göstərilmiş üç yoldan biri ilə parçalanırlar. mRNT-lərin əksəriyyəti üçün, *deadenilləşmədən-asılı olan yolun* bu cür davam edir: poli(A) quyruğun uzunluğu tədricən deadenilləşmə nukleazasının fəaliyyəti ilə qısalır. Quyruq kifayət qədər qısaldıqda, PABPC1 molekulları daha ona birləşə bilmirlər və 5′ papağın və translyasiyanın inisiasiyası faktorlarının qarşılıqlı əlaqələrini stabilləşdirə bilmir (bax Şəkil 5-23, translyasiyanın inisiasiyasının ümumiləşdirilmiş təsvirində). Sonra, təsirə məruz qalan papaq dekappinq fermentlə (DCP1/DCP2) uzaqlaşdırılır və müdafiəsiz qalmış mRNT 5′→3′ eqzonukleaza XRN1 tərəfindən parçalanır. Poli(A) quyruğun uzaqlaşdırılması da mRNT-nin 5′→3′ eqzonukleazaya malik olan sitoplazmatik eqzosomlar tərəfindən parçalanmasını mümkün edir. Mayada 5′→3′ eqzonukleazalar yolu üstünlük təşkil edir, məməlilərin hüceyrələrində isə 5′→3′ eqzosom yolu üstünlük təşkil edir. Dekappinq fermentləri və 5′→3′ eqzonukleazalar sitoplazmada RNP-lərin qeyri adi dərəcədə yüksək qatılıqlı rayonları olan P cismlərdə (aşağıda təsvir edilir, prosessinq cismləri) qatılaşırlar.

Bəzi mRNT-lər əsasən *deadenilləşmədən-asılı olmayan papaqsızlaşma yolu* ilə parçalanır (bax Şəkil 10-27b). mRNT-nin 5′ sonluğunda müəyyən ardıcıllıqlar 5′ papağı dekappinq fermentə həssas edirlər. Bu mRNT-lər üçün papağın uzaqlaşdırılması sürəti onların özlərinin parçalanması sürətinə nəzarət edir, çünki 5′ papaq uzaqlaşdırılanda mRNT tez bir şəkildə 5′→3′ eqzoribonukleaza XRN1 vasitəsi ilə hidroliz olunur.

Bəzi başqa mRNT-lər, papağın uzaqlaşdırılması və vacib deadenilləşmənin daxil olmadığı *endonukleolitik yolla* parçalanırlar (Şəkil 10-27). Bu tipli yollara bir nümunə aşağıda müzakirə olunan RNT müdaxilə (RNTi) yoludur. Hər bir siRNT-RISC kompleksi minlərlə hədəf olunan RNT molekullarını parçalaya bilir. Daxili kəsilmələr nəticəsində yaranan fraqmentlər sonra eqzonukleazalarla parçalanırlar.

mRNT-nin deadenilləşmə dərəcəsi mRNT-nin translyasiyasının inisiasiyası tezliyinə tərs mütənasib dəyişir: inisiasiyanın sürəti nə qədər yüksək olarsa deadenilləşmənin sürəti də bir o qədər aşağı olur. Böyük ehtimalla, bu nisbət 5′ sonluğa birləşmiş translyasiyanın inisiasiyası faktorları ilə poli(A) quyruğa birləşmiş PABPC1 arasındakı resiprokal qarşılıqlı əlaqələrin hesabına olur. Yüksək sürətlə translyasiya olunan mRNT-də inisiasiya faktorları çox vaxt papağa birləşmiş vəziyyətdə olaraq PABPC1-in birləşməsini stabilləşdirirlər və beləliklə də poli(A) quyruğu eqzonukleazalarla deadenilləşmədən qoruyurlar.

Məməlilərin hüceyrələrində az yaşıyan çoxsaylı mRNT-lər – qatılıqları sürətlə dəyişilən sitokinlər və transkripsiya faktorları kimi zülalları kodlaşdıran mRNT-lər – özlərinin 3′ translyasiya olunmayan rayonlarında AUUUA ardıcıllığının çoxsaylı, bəzən üst-üstə düşən nüsxələrinə malik olurlar. Bu ardıcıllıqlar *AU zəngin elementlər* kimi məlumdur. Aşkar edilmişdir ki, spesifik RNT-birləşdirən zülallar 3′ AU-zəngin ardıcıllığa birləşir, həmçinin deadenilləşdirən ferment də eqzosomla qarşılıqlı əlaqəyə girir və bu mRNT-lərin sürətli deadenilləşməsinə, ardınca da 5′→3′ parçalanmasına səbəb olur. Bu mexanizm, mRNT-nin parçalanma sürətini translyasiyanın tezliyindən ayrır. Beləliklə, AU-zəngin elementlərə malik olan mRNT-lər yüksək tezlikdə translyasiya oluna bilərlər və çox tez də parçalana bilərlər, bu yolla kodlaşdırılan zülalın qısa partlayışlarla ekspressiyasına imkan yaradırlar.



ŞƏKİL 10-27 Eukariotik mRNT-lərin parçalanması yolları. (a) mRNT parçalanmasının çox yayılmış yolunda, deadenilləşmədən-asılı olan yolda poli(A) quyruq proqressiv olaraq deadenilaza ilə 20 nukleotid uzunluğa və ya bir neçə A qalıqlarına çatana qədər qısalır, bu vəziyyətdə PABPC1 ilə qalan poli(A) arasında qarşılıqlı əlaqənin stabilliyi itir və bu 5′ papaq ilə translyasiyanın-inisiasiyası faktorları arasındakı qarşılıqlı əlaqənin zəifləməsinə səbəb olur (bax Şəkil 5-23). Sonra, deadenilləşmiş mRNT ola bilsin ki, ya (1) DCP1/DCP2 deadenilləşmə kompleksi vasitəsilə papağı itirir və XRN1 5′→3′ eqzonukleaza vasitəsi ilə parçalanır və ya (2) sitoplazmatik

eqzosomlarda 5′→3′ eqzonukleazalar vasitəsi ilə parçalanır. (b) Başqa mRNT-lər deadenilləşmədən öncə papağı itirir və sonra XRN1 5′→3′ eqzonukleaza vasitəsi ilə parçalanır. Mayada göstərilən nümunədə, RNT-birləşdirən zülal Rps28B öz RNT-sində 3′-UTR-da ardıcıllığa birləşir, sonra Edc3 (papaqsızlaşma enhanseri 3) ilə qarşılıqlı əlaqəyə girir. Sonra, Edc3 dekappinq fermenti DCP1/2-ni mRNT-yə cəlb edir, Rps28B-nin ekspressiyasını avtotənzimləyir. (c) Bəzi mRNT-lər daxildən endonukleazalarla doğranır və fraqmentlər sitoplazmatik eqzosomlarla və XRN1 eqzonukleaza ilə dağıdılır. Bax N. L. Garneau, J. Wilusz, and C. J. Wilusz, 2007, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:113.

P cismlər sıx sitoplazmatik domenlər olub ribosomların ölçüsündən dəfələrlə böyük olurlar. Onlar ribosomlara və ya translyasiya faktorlarına malik olmayan translyasiyanın repressiyası saytlarıdır. Onlar həmçinin sitoplazmada mRNT-nin əsas parçalanma saytlarıdır. Sitoplazmanın çox sıx olan bu rayonları papaq-dağıdan (decapping) fermentlərə (DCP1/DCP2), decapping fermentlərin aktivatorlarına (DHH, PAT1, LSAM1-7), əsas 5′→3′ eqzonukleaza XRN1-ə, eləcə də sıx birləşmiş mRNT-lərə malikdir. P cismlər dinamik quruluşlar olub ölçüləri mRNP-lərin onlara birləşməsi dərəcəsindən, mRNT-lərin parçalanması dərəcəsindən və mRNP-lərin P cismlərdən ayrılıb çıxması və yenidən translyasiya olunmuş mRNP-lər toplusuna (pool) daxil olması dərəcəsindən asılı olaraq genişlənir və yığılırlar. Biz tezliklə görəcəyik ki, translyasiyası miRNT-lərin natamam əsas cütü əmələ gətirməsi ilə ingibirləşən mRNT-lər P cismlərin əsas komponentləridirlər.

mRNT-lərdə və lncRNT-lərdə Adeninlər N^6 Metilləşmə ilə Posttranskripsiya Modifikasiya Oluna Bilərlər

Sintez olunduqdan sonra C-metilləşmə ilə modifikasiya oluna bilən (əsasən metil CpG-birləşdirən zülallarla transkripsiyanın repressiyasına səbəb olur, bax Fəsil9, bölmə 7) DNT-də olduğu kimi, pre-mRNT-lər, mRNT-lər və lncRNT-lər transkripsiya olunduqdan sonra əsasların modifikasiyasına uğraya bilirlər. mRNT-nin çox rast gəlinən post-transkripsiya əsas modifikasiyasının, adeninin N^6 vəziyyətində metilləşməsinin (m^6A) funksiyaları intensiv tədqiqat sahəsidir. Məməlilərin hüceyrələrində mRNT-lərdə və kodlaşdırmayan uzun RNT-lərdə (lncRNT) hər 2000 əsasdan biri m^6A-dır, orta hesabla hər bir mRNT-yə 3-5 m^6A olur. m^6A saytlar bütün rRNT-lərdə, bütün snRNT-lərdə və bütün tRNT-lərin TΨCG ilgəklərində (bax Şəkil 5-20) tapılmışdır. Əksinə, mRNT-lər və lncRNT-lər arasında bütün molekulların yalnız bir fraksiyası m^6A-ya malikdir, bu vaxta qədər analiz olunan bir sıra mRNT-lərin və lncRNT-lərin 10-dan 70 faizə qədərində olmuşdur. Amma, m^6A insanda 7000-dən artıq zülal kodlaşdıran genlərin transkriptlərində və 300 lncRNT-lərdə tapılmışdır. O həmçinin intronlarda aşkar edilmişdir, bu göstərir ki, o pre-mRNT-lərə ko-transkripsiya yolu ilə əlavə edilə bilir. mRNT-lərdə m^6A-ların yüxarı faizi stop kodon yaxınlığında, 3′ translyasiya olunmayan rayonlarda və qeyri adi şəkildə uzun daxili eqzonlarda yerləşirlər.

DNT-də olduğu kimi, spesifik fermentlər metil qruplarını spesifik sayta S-adenozil metionindən (çox biokimyəvi reaksiyalar üçün metil qrupunun ümumi donoru) əlavə edirlər və aşkar edilmişdir ki, fermentlər RNT metil qruplarını uzaqlaşdıra bilirlər. Bu müşahidələr belə bir imkanı ortaya qoydu ki, xüsusi bir mRNT molekulunun m^6A modifikasiyası dinamik tənzimlənə bilər. Amma, bu fermentlər əsasən nüvə fermentləridir, belə ki, mRNT m^6A ilə modifikasiya olunduqdan sonra o, sitoplazmada de-metilləşmir. Qeyd etmək vacibdir ki, zülalların m^6A-modifikasiya olunmamış mRNT-lərə nisbətən m^6A-modifikasiya olunmuş mRNT-lərə daha böyük üstünlüklə birləşdikləri aşkar edilmişdir. DNT-nin C-metilləşməsinə anoloji olaraq, bu sinif zülallar m^6A modifikasiyanın funksiyası(ları)nı yerinə yetirə bilərlər.

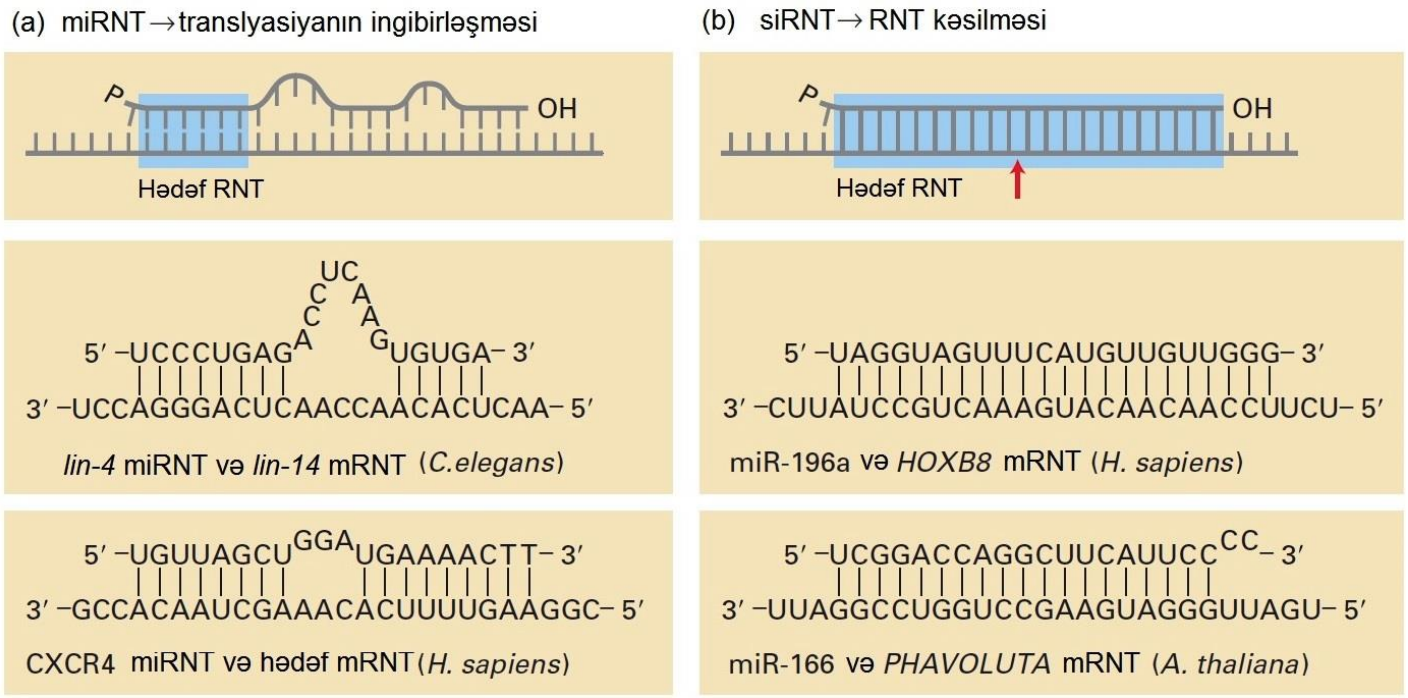
Son zamanların tədqiqatları spesifik mRNT-lərin "həyat tsikli"nin RNT splaysinqi, nüvə eksportu, translyasiya və parçalanması kimi çox aspektlərinə m^6A-nın təsir edə bildiyini göstərir. *Drosophila*-da və *A. thaliana* bitkisində tək bir mRNT m^6A metil transferaza vardır və hər iki orqanizmdə bu genin nokautu embrional öldürücü təsir ilə nəticələnir və m^6A modifikasiyanın əhəmiyyətini təsdiq edir. m^6A saxlayan RNT molekulları metilləşməmiş eyni RNT ilə müqayisədə az stabil olurlar. Bununla əlaqədar olaraq, göstərilmişdir ki, m^6A-birləşdirən zülallar m^6A saxlayan RNT-lərin P cismlərlə assosasiyasını induksiya edirlər, bu da potensial olaraq əsas modifikasiyasının mRNT translyasiyasına və sabitliyinə necə təsir etdiyini göstərir. m^6A-dan başqa, dörd əsasın yüzlərlə başqa modifikasiyaları da RNT-lərdə xarakterizə olunmuşdur. Aydındır ki, bu əsas modifikasiyalarının funksiyaları haqqında hələ çox şey öyrənilməlidir.

Mikro RNT-lər spesifik mRNT-lərin Translyasiyasını Repressiya Edirlər

Mikro RNT-lər (miRNT-lər) ilk dəfə nematod *C.elegans*-da, orqanizmin inkişafında fəaliyyət göstərərn *lin-4* və *let-7* genlərin mutasiyalarının analizi zamanı aşkar olunmuşdur. Təbii formalı *lin-4* və *let-7*-nin klonlaşdırılması və analizi aşkar etdi ki, onlar zülal məhsulunu kodlaşdırmırlar, əksinə uyğun olaraq 21 və 22 nukleotid uzunluqda RNT-ləri kodlaşdırırlar. Bu RNT-lər spesifik hədəf mRNT-nin 3′ translyasiya olunmayan rayonu (3′ UTR) ilə hibridləşirlər. Məsələn, embriogenezin erkən dövründə ekspressiya olunan *lin-4* miRNT sitoplazmada həm *lin-14* həm də *lin-28* mRNT-lərin 3′ UTR-ı ilə hibridləşir və onların translyasiyasını repressiya edir. *lin-4* miRNT-nin ekspressiyası inkişafın sonrakı dövründə kəsilir, bu zaman yeni sintez olunan *lin-14* və *lin-28* mRNT-lərin translyasiyasına imkan yaranır. *let-7* miRNT-nin ekspressiyası bütün bilateral simmetrik heyvanlarda embriogenez gedişində müqayisə olunan zamanda baş verir.

Translyasiyanın miRNT ilə tənzimlənməsi bütün çoxhüceyrəli bitkilərdə və heyvanlarda geniş yayılmışdır. Son bir neçə ildə, 20-26 nukleotid ölçülü kiçik RNT-lər, çoxsaylı model orqanizmlərin müxtəlif toxumalarından ayrılıb klonlaşdırılmış və ardıcıllığı oxunmuşdur. Son zamanların hesablamaları göstərdi ki, bütün i nsan genlərinin təxminən üçdə-birinin ekspressiyası müxtəlif toxumalardan ayrılmış təxminən 1900 insan miRNT-ləri ilə tənzimlənirlər. Çoxsaylı mRNT-lərin bir miRNT ilə tənzimlənməsi potensialı çox yüksəkdir, ona görə ki, miRNT ilə onların tənzimlədiyi mRNT-lərin 3′ sonluğunun ardıcıllığı arasında əsas cütü əmələgəlmənin mükəmməl olması vacib deyil (Şəkil 10-28). Faktiki olaraq, sintetik miRNT-lərlə aparılan kifayət qədər eksperimentlər göstərdilər ki, miRNT-nin altı və ya yeddi 5′ nukleotidi ilə onun hədəf mRNTsinin 3′ translyasiya olunmayan rayonu arasındakı

komplementarlıq hədəf mRNT-nin seçilməsi üçün kritik əhəmiyyət kəsb edir.



ŞƏKİL 10-28 Hədəf RNT-lərlə əsas cütü əmələgətirmə miRNT və siRNT-ləri fərqləndirir. (a) miRNT-lər öz hədəf mRNT-ləri ilə qüsurlu şəkildə əsas cütü əmələ gətirərək mRNT-nin translyasiyasını repressiya edirlər. miRNT-nin 2-dən 7-ə qədər nukleotidi (mavi işarələnmişdir) spesifik mRNT-nin hədəf edilməsi üçün çox əhəmiyyətlidir. Aşağıda göstərilmiş CXCR4 miRNT transfeksiya yolu ilə hüceyrəyə keçirilmiş sintetik oliqonukleotiddir. (b) siRNT öz hədəf RNT-si ilə mükəmməl hibridləşir, mRNT-nin qırmızı oxla göstərilən nahiyələrindən doğranmasına səbəb olaraq onun tez bir şəkildə parçalanmasını işə salır. Bax P.D. Zamore and B. Haley, 2005, *Science* **309**: 1919.

miRNT-lərin əksəriyyəti bir neçə yüzdən minə qədər nukleotid uzunluqda olan pri-miRNT (əsas-*primari* transkript) adlanan RNT polimeraza II transkriptindən prosess olunurlar (Şəkil 10-29). Pri-miRNT-lər bir və ya daha artıq miRNT-lərin ardıcıllığına malik olurlar. miRNT-lər həmçinin bəzi kəsilmiş intronlardan və bəzi pre-mRNT-lərin 3′ UTR rayonlardan prosess olunurlar. Bu uzun transkriptlər daxilində sütun hissəsində təxminən 70 nukleotid uzunluqda olan, natamam əsas cütü əmələ gətirən sancaq quruluşunda bükülmüş uzun ardıcıllıqlar vardır. *Droşa* adlanan iki-zəncirli RNT-yə spesifik olan nüvə RN-azası insanlarda DGCR8 (DiGeorge sindromu xromosomal rayon 8, bu genetik xəstəliklə bağlı adlandırılmışdır) adlanan (*Drosophila*-da Paşa) iki-zəncirli RNT-birləşdirən nüvə zülalı ilə fəaliyyət göstərir və uzun sələf RNT-də heparin rayonunu kəsərək pre-miRNT-ni yaradır. Pre-miRNT-lər spesifik nüvə eksport faktoru *Eksportin5* tərəfindən tanınaraq ona birləşir, bu ona nüvə məsamələri kompleksinin daxili kanalından diffuziya edərək keçməsinə imkan verir. O sitoplazmaya çatdıqdan sonra, *Dicer* adlanan sitoplazmatik iki-zəncirli RNT-spesifik RN-aza insanın TRBP (*Tar* birləşdirən zülal; *Drosophila*-da Loguacious-danışqan) adlanan sitoplazmatik iki-zəncirli RNT-birləşdirən zülal ilə birlikdə fəaliyyət göstərərək pre-miRNT-ni sitoplazmada ikizəncirli miRNT-yə prosess edir. İkizəncirli miRNT 21-23 nukleotid uzunluqda zəncirlərə malik olan və hər iki ucunda iki cütləşməyən 3′-nukleotidləri olan A-formalı RNT zəncirirnin təxminən iki dönməsindən ibarətdir. Nəhayət sonda, iki zəncirdən biri, konservativ tanınma ardıcıllığına malik olan zülallar ailəsinin nümayəndəsi olan, çoxdomenli *Arqonaut* zülalla birləşmiş yetkin bir-zəncirli miRNT-nin və eləcə də başqa zülalların daxil olduğu yetişmiş **RNT-ilə induksiya olunan susan kompleksdə** (**RISC**) yığılmaq üçün seçilir. Bəzi orqanizmlərdə, xüsusən də bitkilərdə bir neçə Arqonaut zülal ekspressiya olunur və müxtəlif funksiyalara malik olan fərqli RISC kompleksləri tapılmışdır. İnsanlar dörd arqonaut zülallarını ekspressiya edirlər. AGO2 insanın miRNT-saxlayan RISC komplekslərindəki Arqonaut zülalıdır. İnsanın digər Arqonaut zülalları funksiyalarına görə bir-birini qismən örtür, çünki insanın bütün dörd Arqonaut zülallarının nokautu insanın embrion sütun hüceyrələri üçün öldürücüdür (letaldır), amma bu dörddən istənilən birinin olması sağ qalmaq üçün kifayət edir. Başqa Arqonaut zülallarının siçanın inkişafı zamanı spesifik funksiyası hal-hazırda tədqiq olunur.

miRNT-RISC kompleksi Arqonaut-birləşmiş yetkin miRNT ilə hədəf mRNT-nin 3′ UTR komplementar rayonları arasında əsas cütü əmələ gətirməklə hədəf mRNP-lərlə birləşir (bax Şəkil 10-28). Hədəf mRNT-nin translyasiyasının ingibirləşməsi iki və daha artıq RISC kompleksinin hədəf mRNT-nin 3′-UTR-da fərqli komplementar rayonlara birləşməsini tələb edir. Ümumiyyətlə nə qədər çox RISC kompleksi mRNT-nin 3′ UTR-na birləşirsə translyasiyanın repressiyası da bir o qədər güclü baş verir. Bu mexanizm spesifik hədəf mRNT-nin translyasiyasının kombinasiyalı supressiya olunması üçün tələb olunan miRNT-lərə prosess olunmuş iki və

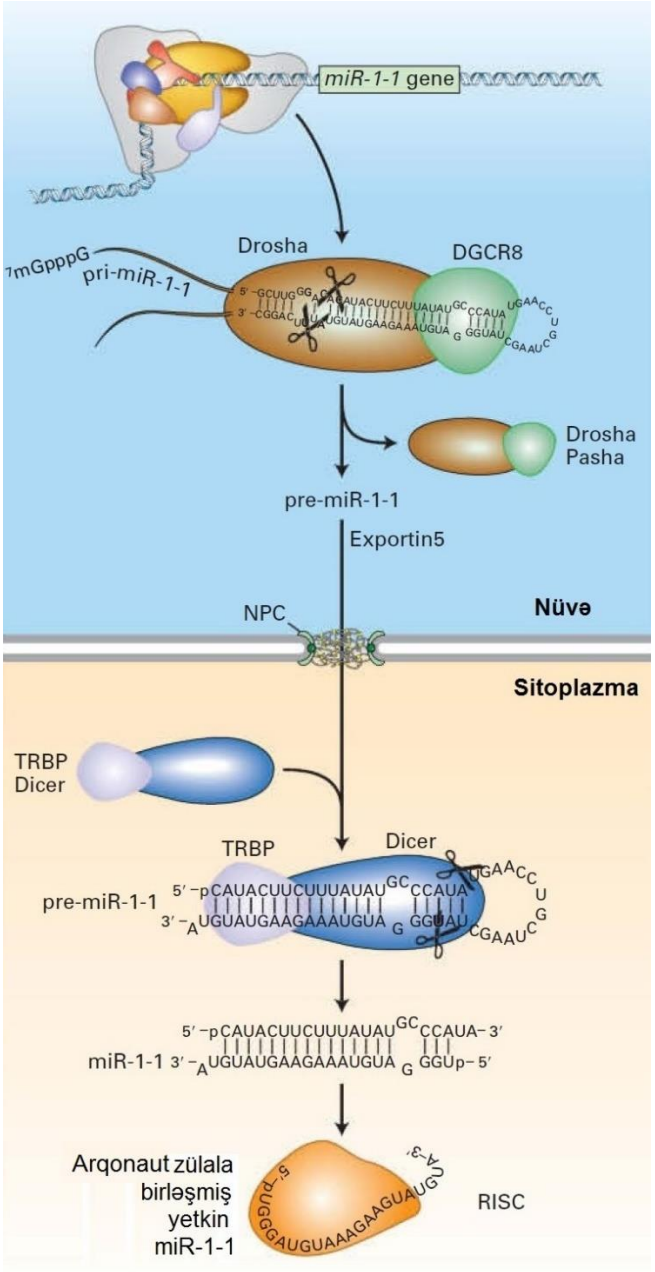
ya daha artıq pri-miRNT-nin transkripsiyasını ayrıca tənzimləməklə mRNT translyasiyasının kombinasiyalı tənzimlənməsinə imkan verir.

Bir neçə RISC kompleksinin mRNT-yə birləşməsinin translyasiyanın inisiasiyasını ingibirləşdirdiyi mexanizm hal-hazırda analiz olunur. RISC komplekslərinin birləşməsi birləşmiş mRNP-lərin P cismlərlə assosasiya etməsinə səbəb olur. P cismlər, mRNT parçalanması üçün əsas saytlar olduğundan və orada papaq ayıran kompleks DPC1/DPC2, 5′→3′ eqzonukleaza XRN1 və sitoplazmatik eqzosomlar toplandığından bir neçə RİSC kompleksinə birləşmiş mRNT-lər parçalanırlar.

Əvəllər qeyd olunduğu kimi, insanın təxminən 1900 müxtəlif miRNT-si qeyd olunmuşdur, onların çoxu embriogenezin gedişində və doğulduqdan sonra spesifik hüceyrə tiplərində və xüsusi zamanda ekspressiya olunurlar. Bu miRNT-lərin funksiyalarının təyin olunması hal-hazırda yüksək dərəcədə fəal tədqiqat sahələrindəndir. Bir nümunədə, miR-133 adlanan spesifik miRNT myoblastların əzələ hüceyrələrinə differensasiya etməsi zaman induksiya olunur. miR-133 *Drosophila*-dakı Sxl kimi fəaliyyət göstərən, tənzimləyici splaysinq faktoru PTB-nin translyasiyasını supressiya edir (bax Şəkil 10-18). PTB çox genlərdə pre-mRNT-lərin 3′ splays-saytlarına birləşir və eqzon buraxılmasına və ya alternativ 3′ splays saytlarının istifadə olunmasına səbəb olur. miR-133 differensasiya edən miyoblast hüceyrələrində ekspressiya olunan zaman, PTB-nin qatılığı aşağı düşür. Nəticədə, çoxsaylı zülalların əzələ-hüceyrələrinin fəaliyyəti üçün əhəmiyyətli olan alternativ izoformaları, differensasiya olunmuş hüceyrələrdə ekspressiya olunur. miRNT ilə tənzimləmənin başqa nümunələr müxtəlif orqanizmlərdə də sürətlə aşkar olunur. Məməlilərdə *diser* genin nokaut olunması miRNT-nin əmələ gəlməsini aradan qaldırır. Bu manipulyasiya, siçanın inkişafının erkən dövründə rüşeymin ölümünə səbəb olur. Amma, *dicer* rüşeyimin yalnız primordia əzalarında nokaut olunan zaman miRNT-nin qeyri əhəmiyyətli əzalarının inkişafına təsiri müşahidə olunur (Şəkil 10-30). Baxmayaraq ki, əzalarda bütün əsas hüceyrə tipləri differensasiya edir və əzaların formalaşmasının fundamental aspektləri saxlanılır, inkişaf qeyri normal gedir, bu da çoxsaylı mRNT-lərin translyasiyasının lazımlı səviyyədə tənzimlənməsində miRNT-lərin əhəmiyyətini göstərir. İnsanın 1900 miRNT-lərindən 53-ü primatlar üçün unikaldır. Çox ehtimal ki, yeni miRNT-lər təkamül prosesi dövründə, pri-miRNT geninin ikiləşməsi (duplikasiyası) və onun ardınca da yetişmiş miRNT-ləri kodlaşdıran əsasların mutasiyası nəticəsində asanlıqla meydana gəlmişdir. miRNT-lər bitkilərdə xüsusən geniş yayılmışdır – *Arabidopsis thaliana* bitkisində 1.5 milliondan artıq müxtəlif miRNT-lər xarakterizə olunmuşdur.

Alternativ Poliadenilləşmə miRNT ilə Nəzarət Variantlarını Artırır

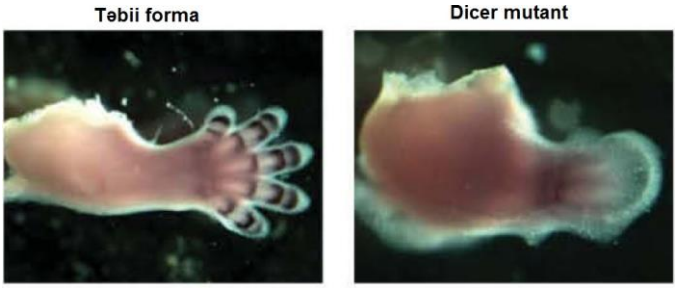
İnsan genlərinin 95 faizinə qədərində bu və ya digər toxumada baş verən alternativ spalysinqdən başqa, insan genlərinin 50 faizinə qədərində alternativ poliadenilləşmə baş verir. Alternativ poliadenilləşmə müxtəlif hüceyrə tiplərində iki və ya daha artıq alternativ poliadenilləşmə siqnallarının istifadə olunması nəticəsində baş verir. Bəzi hallarda bu, müxtəlif hüceyrə tiplərində aşağıya istiqamətdə kəsilmə/poliadenilləşmə siqnalının C/U-zəngin hissəsinə birləşən CStF kompleksə qarşı yuxarı və ya aşağı affinliyə malik olan alternativ poli(A) siqnalla birləşən kəsilmə/poliadenilləşmə faktorlarının müxtəlif qatılıqlarının istifadə olunması nəticəsində baş verir (bax Şəkil 10-15). Bu hallarda, CStF qatılığı aşağı olanda, yalnız yuxarı-



ŞƏKİL 10-29 mRNT prosessinqi. Bu diaqram miR-1-1 miRNT-nin transkripsiyasını və prosessinqini göstərir. Əsas miRNT transkript (pri-miRNT) RNT polimeraza II ilə transkripsiya olunur. Nüvə iki-zəncirli RNT-spesifik endoribonukleaza Droşa, özünün partnyoru iki-zəncirli RNT-birləşdirən zülal DGCR8 (*Drosophila*-da Paşa) ilə pri-miRNT-də ilkin kəsilmələri edir, nüvə transporteri eksportin-5 vasitəsi ilə sitoplazmaya eksport olunan, ~70-nukleotidli pre-miRNT-ni yaradır. Pre-miRNT sonra sitoplazmada iki-zəncirli RNT-birləşdirən zülal TRBP (*Drosophila*-da Loguacious-danışqan) ilə birlikdə Dicer vasitəsilə 3′ uclarında iki əsaslı bir-zəncirə malik olan iki-zəncirli miRNT-yə prosess olunur. Sonda iki zəncirdən biri RISC kompleksinə

daxil olur, burada o Arqonaut zülala birləşir. Bax P.D. Zamore and B. Haley, 2005, *Science* 309:1519

-affinlikli poliadenilləşmə siqnalları istifadə olunur. Amma alternativ hüceyrə tiplərində, o yerdə ki, CStF qatılığı yüksəkdir, yuxarıya istiqamətdə aşağı-affinlikli sayt daha böyük üstünlüklə istifadə olunur, cünki pre-mRNT kəsildikdən sonra aşağıya istiqamətdə sayt istifadə oluna bilmir. Başqa hallarda, ardıcıllıq-spesifik RNT-birləşdirən zülallar splaysinq repressorları və aktivatorlarında olduğu kimi, kəsilmə/poliadenilləşmə faktorlarının birləşməsini blok edə və ya artıra bilər.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 10-30 Əzaların inkişafında miRNT-lərin fəaliyyəti. Mikrofotolar siçanın 13 günlük rüşeymində oynaqların formalaşması markeri Gd5 zülala görə immunrənglənmiş embrional inkişafın normal (*solda*) və Diser nokaut (*sağda*) əzalarını müqayisə edir. Diser, bu hüceyrələrdə yalnız Dicer genin silinməsini induksiya etmək üçün Cre-nin şərti ekspressiyası yolu ilə inkişaf edən siçan rüşeymindən nokaut edilərək çıxarılmışdı (bax Şəkil 6-40). [E.D. Harfe et al., "The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005,* **102***(31):10898–903. Copyright (2005) National Academy of Sciences, USA*.]

Eyni gendən çoxsaylı mRNT-lərin ekspressiya olunması alternativ poliadenilləşmə saytından istifadə edir, əlavə miRNT birləşdirən saytlar uzun 3′ eqzonlara malik olan mRNT-lərdə yerləşir. Bunun nəticəsində, eyni zülalı kodlaşdıran ardıcıllığa malik olan mRNT-lər müxtəlif hüceyrə tiplərində 3′ UTR-in uzunluğundan və həmin hüceyrələrdə ekspressiya olunan miRNT-lərdən asılı olaraq fərqli tənzimlənə bilirlər. Nəticədə, alternativ poliadenilləşmə miRNT-nin translyasiya nəzarətinin və mRNT stabilliyinin nəticəsi kimi eyni zülalı kodlaşdıran mRNT-lərin translyasiyasını tənzimləyə bilir.

Alternativ poliadenilləşmə saytları mRNT-də son eqzonun alternativ splaysinqinə də birləşə bilirlər. Bunun nəticəsi kimi, müxtəlif C-sonluq aminturşu ardıcıllıqlarına malik olan zülal izoformaları ekspresssiya oluna bilir. Bu tip variasiya B-limfositlərin inkişafında alternativ immunoqlobulin molekullarının ekspressiyasında müşahidə olunur (bax Şəkil 23-19). Əvvəlcə, immunoqlobulin anticism, anticismi plazma membranına bərkidən transmembran domenlə və hüceyrəxarici antigen-birləşdirən domenin antigenlə – anticism birləşmiş molekulla rastlaşdığı zaman siqnal verən sitoplazmatik domenlə istehsal olunur. Antigen birləşəndə pre-mRNT-nin prosessinqi elə modifikasiya olunur ki, alternativ 3′ eqzon mRNT daxilində qalır. Bu alternativ prosess olunmuş mRNT-lərdən translyasiya olunan anticism molekulları transmembran domenlərdən məhrum olurlar, nəticədə onlar hüceyrəxarici boşluğa ifraz olunurlar və burada onlar patogenləri neytrallaşdıra bilirlər (bax Fəsil 14 və 23).

Müdaxilə RNT Dəqiq Komplementar Olan mRNT-lərin Parçalanmasını İnduksiya Edir

Müdaxilə RNT-si (RNTi – RNA interfearing) spesifik genlərin ekspressiyasının eksperimental manipulyasiyası zamanı gözlənilmədən aşkar olunmuşdur. Tədqiqatçılar *C. elegans*-da gen ekspressiyasını bir-zəncirli komplementar RNT-ni mikroinyeksiya etməklə ingibirləşdirməyə cəhd edirdilər, bu zaman komplementar RNT kodlaşdırılan mRNT ilə hibridləşməli və onun translyasiyasına mane olmalı idi, bu metod antisens ingibitirləşmə adlandırıldı. Amma nəzarət eksperimentlərində, mükəmməl əsas cütü əmələ gətirən, bir neçə yüz əsas cütü uzunluqda olan iki-zəncirli RNT yalnız antisens zəncirin təklikdə fəaliyyətinə nisbətən genin ekspressiyasının ingibirləşməsində daha çox təsirli olmuşdur (bax Şəkil 6-42). Daxil edilmiş iki-zəncirli RNT ilə gen ekspressiyasının oxşar ingibirləşməsi tezliklə bitkilərdə də müşahidə olundu. Hər iki halda, iki-zəncirli RNT, bu iki-zəncirli RNT-nin zəncirlərindən bir ilə tamilə eyni olan ardıcıllığa malik olan bütün hüceyrə RNT-lərinin parçalanmasını induksiya etdi. mRNT-lərin dağıdılmaq üçün hədəf olunmasında bu metodun spesifikliyinə görə o, genlərin funksiyasını öyrənmək üçün çox güclü eksperimental alətə çevrilmişdir.

Drosophila rüşeyminin ekstraktı ilə aparılan sonrakı biokimyəvi tədqiqatlar göstərdilər ki, RNT müdaxiləsinə vasitəçilik edən uzun iki-zəncirli RNT ilkin olaraq iki-zəncirli qısa müdaxilə RNT-sinə (siRNT) prosess olnur. siRNT-lərin 21-23 nukleotidən ibarət olan zəncirləri bir-birinə elə hibridləşmişlər ki, hər bir zəncirin 3′ sdonluğundakı iki əsas cütləşməmiş vəziyyətdə qalmışdır. Davam edən tədqiqatlar aşkar etdi ki, uzun-ikizəncirli RNT-ni siRNT-lərə doğrayan sitoplazmatik iki-zəncirli RNT-spesifik ribonukleaza, pre-miRNT-nin nüvədən sitoplazmaya eksport olunduqdan sonrakı prosessinqində iştirak edən Diser fermentlə eynidir (bax Şəkil 10-29). Bu kəşf RNT müdaxiləsi ilə translyasiyanın miRNT vasitəsillə repressiyasının çox yaxın proseslər olduğunn reallaşmasına səbəb oldu. Hər iki halda, yetişmiş qısa tək-zəncirli RNT-lər, istər siRNT-lər istərsə də miRNT-lər RISC komplekslərdə toplanırlar və burada onlar Arqonaut zülallarla birləşirlər. siRNT-yə malik olan RISC konpleksini miRNT birləşmiş kompleksdən fərqləndirən odur ki, siRNT hədəf RNT ilə mükəmməl əsas cütü əmələ gətirir və onun doğranmasını induksiya edir, halbuki, miRNT ilə birləşmiş olan RISC kompleksi öz hədəfini natamam əsas-cütünün yaranması ilə tanıyır və nəticədə translyasiyanı ingibirləşdirir, hədəf-mRNT-ni yavaş-yavaş parçalayır (bax Şəkil 10-28).

AGO2 hədəf RNT-nin doğranmasına cavabdeh olan zülaldır. Zülalın bir domeni, RNT-DNT hibridində RNT-ni parçalayan RN-aza H fermentinə homolojidir (bax Şəkil 8-14). RISC kompleksinin siRNT-sinin 5′ sonluğu hədəf mRNT ilə RNT spiralın bir dönməsi məsafəsində (10-12 əsas cütü) mükəmməl əsas cütü əmələ gətirəndə AGO2-nin bu domeni hədəf RNT-nin fosfodiefir əlaqəsini siRNT-nin 10 və 11-ci nukleotididləri arasından kəsir (bax Şəkil 10-28b). Kəsilmiş RNT-lər buraxılır və ardınca sitoplazmatik eqzosomlar və

XRN1 5′→3′ eqzoribonukleazalar tərəfindən parçalanır. Əgər əsas cütü mükəmməl deyilsə, o zaman AGO2 domeni hədəf mRNT-ni kəsmir və ya onu buraxmır. Bunun əvəzində, bir neçə miRNT-RISC kompleksi hədəf mRNT ilə birləşirsə, onun translyasiyası ingibirləşir, mRNT isə P cismlərlə birləşmiş vəziyyətdə qalır, burada o, əvvəllər göstərildiyi kimi, mükəmməl komplementar hədəf RNT-nin RISC kəsilməsi ilə inisiasiya olunan parçalanması yolundan fərqli və daha yavaş olan mexanizmlərlə parçalanır.

İki-zəncirli RNT eukariot hüceyrənin sitoplazmasına daxil ediləndə, o, Dicer və TRBP tərəfindən tanındığından, siRNT-lərin RISC kompleksində toplanması yoluna daxil olur (bax Şəkil 10-29). Müdaxilə RNT-nin bu prosesi, guman olunur ki, həm bitkilərdə həm də heyvanlarda hüceyrənin müəyyən viruslara və mobil genetik elementlərə qarşı ən qədim müdafiə sistemlərindəndir. Dicer və RISC zülallarını kodlaşdıran genlərində mutasiyalara məruz qalan bitkilər RNT virusla yoluxmaya qarşı və onların genomu daxilində transpozonların artan hərəkətinə qarşı yüksək həssaslıq nümayiş etdirirlər. RNT virusların replikasiyası zamanı yaranan iki-zəncirli RNT intermediatlar, guman olunur ki, Dicer ribonukleazalar tərəfindən tanınır və sonda virus mRNT-lərini parçalayan RNTi cavabını induksiya edir. Yerdəyişmə (transpozisiya) zamanı, transpozonlar ixtiyari (nizamsız) istiqamətdə hüceyrə genlərinə keçirilir və onların fərqli promotorlardan transkripsiyası, bir-biri ilə hibridləşə bilən komplementar RNT-ləri istehsal edərək RNTi sistemini inisiasiya edir, bu da sonra əlavə yerdəyişmələr üçün tələb olunan transpozon zülalların ekspressiyasına müdaxilə edir.

Bitkilərdə və *C. elegans*-da müdaxilə RNT-si iki-zəncirli RNT-nin yalnız bir neçə hüceyrəyə daxil edilməsi ilə orqanizmin bütün hüceyrələrində induksiya oluna bilir. Orqanizmlərin belə geniş induksiya olunması, RNT virusların RNT replikazalarına homoloji olan zülalın istehsalını tələb edir. Aşkar olunmuşdur ki, iki-zəncirli siRNT-lər replikasiya edirlər və sonra bu orqanizmdəki başqa hüceyrələrə keçirilirlər. Bitkilərdə, siRNT-lərin keçirilməsi, bitki hüceyrələrinin hüceyrə divarlarını kəsib keçən sitoplazmatik əlaqə olan **plazmodesmatalar** vasitəsi ilə baş verə bilir (bax Şəkil 20-42). Müdaxilə RNT-nin geniş-orqanizm miqyasında induksiyası *Drosophila*-da və ya məməlilərdə baş vermir, yəqin ona görə ki, onların genomları RNT replikazanın homoloqlarını kodlaşdırmırlar.

Məməlilərin hüceyrələrində, uzun RNT-RNT dupleks molekullarının sitoplazmaya keçirilməsi, sonra aşağıda müzakirə olunan, PKR yolu ilə zülal sintezinin ümumiləşmiş ingibirləşməsi ilə nəticələnir. Bu cavab, hədəf olunmuş spesifik mRNT-lərə qarşı RNTi cavabının eksperimental induksiyasında uzun iki-zəncirli RNT-lərin istifadəsini güclü şəkildə məhdudlaşdırır. Xöşbəxtlikdən, tədqiqatçılar aşkar etdilər ki, 21-23 nukleotid uzunluqda olan, 3′ sonluğunda iki-əsasdan ibarət bir-zəncirli rayonlara malik olan iki-zəncirli siRNT-lər zülal sintezinin ümumiləşmiş ingibirləşməsini induksiya etmədən funksional siRNT RISC komplekslərə birləşən bir zəncirli RNT-lərin yaranmasına səbəb olurlar. Bu kəşf tədqiqatçılara imkan verdi ki, onlar sintetik iki-zəncirli siRNT-ləri insan hüceyrələrində və eləcə də digər məməlilərdə spesifik genlərin ekspressiyasının nokdaun olunmasında istifadə etsinlər. Bu **siRNT nokdaun** metodu indi RNTi yolunun özü də daxil olmaqla, çoxsaylı müxtəlif proseslərin öyrənilməsində geniş şəkildə istifadə olunur.

Sitoplazmatik Poliadenilləşmə Bəzi mRNT-lərin Translyasiyasını Təşviq Edir

miRNT-lərdən başqa, bir sıra digər zülallar-vasitəsilə translyasiyaya nəzarət bəzi genlərin ekpressiyasını tənzimləməyə kömək edir. Translyasiyaya nəzarət etmək üçün spesifik zülallarla qarşılıqlı əlaqədə olan mRNT-lərdə tənzimləyici ardıcıllıqlar və ya elementlər əsasən mRNT-nin 3′ və ya 5′ uclarındakı UTR-da yerləşir. Biz burada, 3′ tənzimləyici elementlərin daxil olduğu zülalla-vasitələnən translyasiyaya-nəzarət tipini müzakirə edirik. 5′ tənzimləyici elementlərlə qarşılıqlı əlaqə yaradan, RNT-birləşdirən zülalların daxil olduğu digər mexanizm sonra müzakirə olunacaq.

Çox eukariot mRNT-lərin translyasiyası, 3′ UTR-larda qonşu saytlara kooperativ birləşən ardıcıllıq-spesifik RNT-birləşdirən zülallarla tənzimlənir. Bu onların, enhanser və ya promotor rayonlarında transkripsiya faktorlarının kooperativ birləşməsində olduğu kimi, kombinasiyalı şəkildə fəaliyyət göstərməsinə imkan verir. Tədqiqatların çoxunda, translyasiya zülalların 3′ tənzimləyici elementlərə birləşməsi ilə repressiya olunur və tənzimləmə hüceyrədə və ya inkişaf etməkdə olan rüşeyimdə uyğun zamanda və uyğun nahiyədə derepressiya nəticəsində yaranır. Bu cürə repressiya mexanizmi, translyasiya olunmamışdan öncə *sitoplazmatik poliadenilləşməyə* gedən mRNT-lər üçün daha yaxşı öyrənilmişdir.

Sitoplazmatik poliadenilləşmə heyvanların rüşeyminin erkən inkişaf dövründə gen ekspressiyasının kritik aspektidir. Çoxhüceyrəli heyvanların yumurta hüceyrələri (oositlər) çoxsaylı müxtəlif zülalları kodlaşdıran çox mRNT-lərə malikdirlər, onlar yumurta hüceyrəsi sperma hüceyrələri ilə mayalanana qədər translyasiya olunmayırlar. Bu "ehtiyat" mRNT-lərdən bəziləri, yalnız 20-40 A qalığından ibarət olan qısa poli(A) quyruğa malik olurlar və bunlara yalnız az sayda sitoplazmatik poli(A)-birləşdirən zülallar (PABPC1) birləşə bilirlər. Fəsil 5-də müzakirə olunduğu kimi, mRNT-nin uzun poli(A) quyruğuna birləşmiş çoxsaylı PABPC1 molekulları eIF4G insiasiya faktoru ilə qarşılıqlı əlaqəyə girir, bununla da, translyasiyanın inisiasiyası üçün ltələb olunan mRNT 5′-papğın eIF4G ilə qarşılıqlı əlaqəsini stabilləşdirir (bax Şəkil 5-23). Bu stabilləşmənin baş verməsi qısa poli(A) quyruğa malik olan mRNT-lərlə mümkün olmadığından belə mRNT-lər səmərəli şəkildə translyasiya olunmurlar. Yumurta hüceyrəsinin yetişməsi prosesində müvafiq zamanda və ya yumurta hüceyrəsinin mayalanmasından sonra, adətən xarici siqnallara cavab olaraq, təxminən 150 A qalığı sitoplazmada bu mRNT-lərin qısa poli(A) quyruqlarına əlavə edilir və beləliklə onların translyasiyası stimullaşdırılır.

Xenopus oositində saxlanılan miRNT-lərlə aparılan tədqiqatlar, translyasiyaya nəzarətin bu tip mexanizmini izah etməyə kömək etdi. Qısa quyruqlu mRNT-lərin yumurta hüceyrəsinə keçirilməsi ilə aparılan eksperimentlər göstərdi ki, onların sitoplazmada poliadenilləşməsi üçün 3′ UTR hissəsində iki ardıcıllıq tələb olunur: nüvədə də pre-mRNT-lərin poliadenilləşməsi üçün tələb olunan AAUAAA poli(A) siqnal və yuxarıya istiqamətdə U-ilə zəngin *sitoplazmatik poliadenilləşmə elementinin* (*CPE*) bir və ya daha artıq nüsxəsi.

Bu tənzimləyici element, yüksək dərəcədə konservativ olan, RRM domeninə və sink-barmaq domeninə malik olan *CPE-birləşdirən zülalla* (*CPEB*) birləşir.

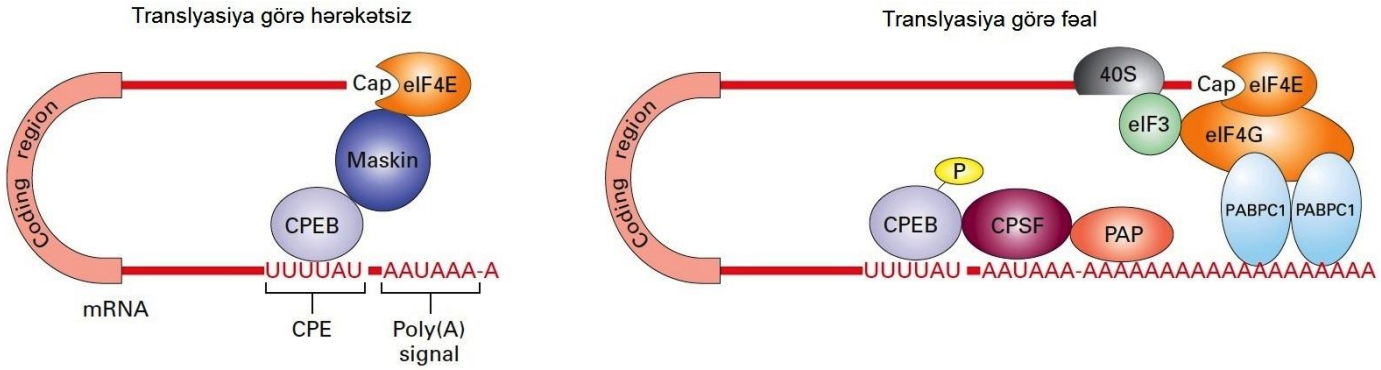
Stumullaşdırıcı siqnal olmadıqda, U-ilə zəngin CPE ilə birləşmiş CPEB, Maskin zülalı ilə qarşılıqlı əlaqəyə girir, o isə öz növbəsində, mRNT-nin 5′ papağı ilə assosasiyada olan eIF4E ilə birləşir (Şəkil 10-31 *solda*). Nəticədə, eIF4E başqa inisiasiya faktorları ilə və ya kiçik ribosomal subvahidlə əlaqə yarada bilmir, beləliklə translyasiyanın inisiasiyası dayandırılmış olur. Oositin yetişməsi gedişində, CPEB-n xüsusi serin qalığı fosforlaşır və Maskinin kompleksdən dissosasiya etməsinə səbəb olur. Bu, parçalanmanın və poliadenilləşmənin spesifikliyi faktorunun (CPSF) sitoplazmatik formasının və poli(A) polimerazanın CPEB ilə birlikdə mRNT-yə kooperativ birləşmələrinə imkan verir. Poli(A) polimeraza A qalıqlarının əlavə edilməsini kataliz etdikdən sonra, PABPC1 uzadılmış poli(A) quyruqla birləşə bilir və translyasiyanı inisiasiya etmək üçün lazım olan bütün faktorların stabilləşmiş qarşılıqlı əlaqələrinin yaranmasına səbəb olur (Şəkil 10-31, *sağda*; həmçinin bax Şəkil 5-23). *Xenopus* oositinin yetişməsi zamanı CPEB-i fosforlaşdıran proteinkinaza proqesteron hormonuna cavab olaraq fəallaşır. Beləliklə, oositlərin yetişməsi üçün lazım olan ehtiya saxlanılmış zülalı kodlaşdıran mRNT-lərin translyasiya olunma vaxtı bu xarici siqnalla tənzimlənir.

Kifayət qədər dəlillər göstərir ki, translyasiyaya nəzarətin oxşar mexanizmi öyrənmədə və yaddaşda da rol oynayır. Mərkəzi sinir sistemində, minlərlə və daha artıq neyronlardan çıxan aksonlar vahid postsinaptik neyronun dentritləri ilə sinapslar (əlaqə) yarada bilirlər (Şəkil 22-31). Bu aksonlardan biri stimullaşanda, postsinaptik neyron bu minlərlə sinapsların hansı birinin stumullaşdığını "yadda saxlayır". Növbəti dəfə bu sinaps stimullaşarkən postsinaptik hüceyrələrdə yaranan cavabın gücü birinci dəfəkindən fərqlənir. Göstərilmişdir ki, cavab reaksiyasındakı bu dəyişiklik əsasən sinapsın bu rayonunda ehtiyat saxlanılan mRNT-lərin translyasiyasının fəallaşmasının nəticəsidir ki, bu da sinapsların ölçüsünün böyüməsinə və onların neyrofizioloji xüsusiyyətlərinin dəyişməsinə aparan yeni zülalların lokal sintezinə səbəb olur. CPEB-nin neyronal dentritlərdə aşkar olunması belə bir təklifin yaranmasına səbəb oldu ki, sitoplazmatik poliadenilləşmə dentritlərdə spesifik mRNT-lərin translyasiyasını onun oositlərdə (yumurta hüceyrələrində) etdiyindən daha çox güclü stimullaşdırır. Çox ehtimal ki, bu halda, sinaptik fəallıq (hormon əvəzinə) CPEB-in fosforlaşmasını induksiya edən və uyğun olaraq translyasiyanı fəallaşdıran xarici siqnaldır.

Zülalların Sintezi Qlobal Tənzimlənə Bilir

Başqa proseslərə daxil olan zülallar kimi, translyasiyanın inisiasiyası faktorları və ribosomal zülallar fosforlaşma kimi post-translyasiya modifikasiyası yolu ilə tənzimlənə bilir. Belə tənzimləmə mexanizmləri mRNT-lərin əksəriyyətinin translyasiya dərəcəsinə və beləliklə, hüceyrənin ümumi zülal sintezinin sürətinə təsir edir.

TOR yolu TOR yolu, *Streptomyces* bakteriya ştammı tərəfindən sintez olunan, orqan transplantasiya olunmuş xəstələrdə immun cavabı sisteminin susdurulması üçün istifadə olunan, antibiotik rapamisinin təsiri mexanizminin tədqiqatları zamanı aşkar olunmuşdur. *Rapamisinin hədəfi* (*target of rapamycin – TOR*), hüceyrə inkişafının rapamisinlə ingibirləşməsinə dözümlü olan maya mutantlarının ayrılması ilə identifikasiya olunmuşdur.



ŞƏKİL 10-31 Sitoplazmatik poliadenilləşmə və translyasiyanın inisiasiya olunmasına nəzarət modeli. (*Solda*) Yetişməmiş oositdə, U-zəngin sitoplazmatik poliadenilləşmə elementlərinə (CPE) malik olan mRNT-lərin qısa poli(A) quyruğu olur. CPE-birləşdirən zülal (CPEB) tranlyasiyanın represiyasını təsvir olunan qarşılıqlı təsir vasitəsilə həyata keçiirir, bu zaman mRNT-nin 5′ ucunda inisiasiya kompleksinin toplanmasına mane olur. (*Sağda*) Oositlərin hormonal stimullaşması CREB-i fosforlaşdıran proteinkinazanı fəallaşdırır və CREB-in Maskini itirməsinə səbəb olur. Kəsilmə və poliadenilləşmə spesifikliyi faktoru (CPSF) sonra poli(A) sayta birləşir, həm birləşmiş CREB həm də poli(A) polimerazanın sitoplazmatik forması (PAP) ilə qarşılıqlı əlaqəyə girir. Poli(A) quyruq uzunadıqdan sonra, sitoplazmatik poli(A)-birləşdirən zülal 1 (PABPC1) ona birləşə bilir və ribosomun 40S subvahidi ilə qarşılıqlı təsirə girmək və translyasiyanı inisiasiya etmək üçün başqa inisiasiya faktorları ilə fəaliyyət göstərən eIF4G ilə qarşılıqlı əlaqəyə girir. Bax R. Mendez and J.D. Richter, 2001, *Nat. Rev. Cell Biol.* **2**:512.

TOR çox böyük (~2400 aminturşu qalığından ibarət) proteinkinaza olub maya hüceyrələrində qidalanma statusuna cavab olaraq bir sıra hüceyrə proseslərini tənzimləyir. Məməlilərdə, çoxhüceyrəli eukariotlarda *mTOR* (*mammalian TOR*) hüceyrə-səthi siqnal zülallarından gələn çoxsaylı siqnallara cavab verərək hüceyrənin çoxalmasını inkişaf

proqramları ilə və eləcə də qidalanma statusu ilə koordinasiya edir.

Məməlilərdə, mTOR iki tip multizülal komplekslərdə, mTOR kompleks 1 və 2-də (mTORC1 və mTORC2) toplanmışdır. mTORC1-in proteinkinaza fəallığı lizosomlarda amin turşularının mövcud olmasına cavab olaraq artır. Onun proteinkinaza fəallığı həmçinin hüceyrənin böyüməsi üçün kifayət edən ATP səviyyəsi ilə, oksigen ilə və boy faktorları reseptorlarının verdiyi siqnallarla da artır (bax Fəsil 16). mTORC1 hipoksiya və ATP ilə qidalanmanın aşağı səviyyəsi də daxil olmaqla müxtəlif tipli hüceyrə stresləri ilə ingibirləşir. mTOR kompleksi də rapamisinlə ingibirləşir. Fəal mTORC1 hüceyrə böyüməsini təşviq etmək üçün hüceyrə metabolizmini tənzimləyir və ribosomun sintezini və translyasiyanı stimullaşdırır. O həmçinin, bütöv ribosomlar, mitoxondrilər və başqa orqanoidlər daxil olmaqla sitoplazmanın böyük hissəsinin ikiqat membranla əhatə olunduğu prosesi, autofagiyanı ingibirləşdirir, sonra lizosomlarla qovuşan autofaqosomları yaradır, bu zaman onların tərkibi stress zamanı və qida təminatı aşağı olan zaman vacib qida maddələrini təmin etmək üçün doğranır (həzm olunur). Başqa kompleks, mTORC2 rapamisinə qarşı qeyri həssasdır. O fəal olanda, hüceyrənin formasına və hərəkətinə nəzarət edən aktin sitoskeleti tənzimləyir (bax Fəsil 17), o həmçinin, makromolekulların və membranların doğranmış məhsullarını yenidən istifadəyə qaytaran, onların faqositoz hüceyrələr tərəfindən sorulmasına imkan yaradan (bax Fəsil 21), yüksək dərəcədə təşkil olunmuş, tənzimlənən hüceyrə ölümünü, apoptozu ingibirləşdirir.

mTORC1-in funksiyası haqqında bizim müasir anlayışlarımız Şəkil 10-32-da cəmləşdirilmişdir. Fəal mTORC1, translyasiyanı bilavasitə tənzimləyən iki kritik zülal tipini fosforlaşdırmaqla zülal sintezinin ümumi gedişini stimullaşdırır. Xatırladaq ki, eukariotik mRNT-nin translyasiyasının birinci pilləsi eIF4 inisiasiya kompleksinin onun eIF4E papaq-birləşdirən subvahid vasitəsilə (bax Şəkil 5-23) 5′ papağa birləşməsidir. Fəal eIF4E-in qatılığı eIF4E ilə mRNT-nin 5′ papağı arasında qarşılıqlı əlaqəni ingibirləşdirən homoloji *eIF4E-birləşdirən zülalların (4E-BP)* kiçik ailəsi vasitəsilə tənzimlənir. 4E-BP-lər TORC1-in bilavasitə hədəfləridirlər. 4E-BP-lər TORC1-lə fosforlaşarkən eIF4E-ni buraxaraq translyasiyanın inisiasiyasını stimullaşdırırlar. mTORC1 başqa proteinkinazanı, S6 kinazanı (S6K) da fosforlaşdıraraq fəallaşdırır, o isə kiçik ribosomal subvahidin zülalı S6-nı və əlavə substratları fosforlaşdırır və zülal sintezinin sürətinin daha da artmasına səbəb olur.

5′ UTR-da primidin sırasına malik olan, TOP mRNT-lər (TOP – oliqopirimidin traktına, ***t***ract of ***o***ligo***p***yrimidine, göstərir) adlanan xüsusi mRNT dəstlərinin translyasiyası mTORC1 ilə xüsusən güclü şəkildə stimullaşır. TOP mRNT-lər ribosomal zülalları və translyasiyanın elonqasiyası faktorlarını kodlaşdırır. mTORC1 ilə fəallaşan S6K RNT polimeraza I transkripsiya faktoru TIF-1A-nı fəallaşdıraraq böyük rRNT sələfin transkripsiyasını stimullaşdırır (bx Şəkil 9-51). mTORC1 həmçinin RNT polimeraza III ingibitoru MAF1-i fosforlaşdırır, bununla da 5S rRNT və tRNT-lərin sintezini stimullaşdırır. Bundan əlavə, mTORC1, ribosomal zülalları və translyasiya faktorları genlərinin transkripsiyasını stimullaşdıran iki RNT polimeraza II aktivatorlarını fəallaşdırır. Sonda, mTORC1 böyük rRNT sələfin prosessinqini stimullaşdırır (bax Bölmə 10.5). Bir sıra mTORC1 substratların bu cürə fosforlaşması nəticəsində, ribosomların sintezi və toplanması və eləcə də translyasiya faktorlarının və tRNT-lərin sintezi güclü şəkildə artır. Alternativ olaraq, mTORC1-in kinaza fəallığı ingibirləşəndə, bu substratlar fosfor qalığını buraxır (defosforlaşır) və zülal sintezinin gedişini və ribosomların, translyasiya faktorlarının və tRNT-lərin istehsalını kəskin şəkildə zəiflədərək hüceyrənin inkişafını (çoxalmasını) dayandırır.

mTORC1 fəallığı, Ras zülallar ailəsindən olan Rheb adlanan monomer kiçik G zülalla tənzimlənir. Başqa kiçik G zülallar kimi, Rheb GTP-yə birləşmiş vəziyyətdə olanda öz fəal konformasiyasında olur (bax Şəkil 15-4 və 15-5). Rheb•GTP mTORC1 kompleksə birləşir, ehtimal ki, onun kinaza domenində konformasiya dəyişikliyini induksiya etməklə mTORC1 kinaza fəallığını stimullaşdırır. Rheb öz növbəsində, aşağıda müzakirə olunduğu kimi, tibbi sindrom ***t***uberoz ***s***kleroz kompleksinə daxil olduğuna görə adlandırılan TSC1 və TSC2-dən ibarət olan heterodimerlə tənzimlənir. TSC1/TSC2 heterodimer fəal konformasiyada, Rheb üçün GTP-aza fəallaşdırıcı zülal kimi (Rheb-GAP kimi) fəaliyyət göstərir və Rheb-ə birləşmiş GTP-nin GDP-yə hidroliz olunmasına səbəb olur. Bu Rheb-i onun, mTORC1 kinazanı fəallaşdırmayan GDP-birləşmiş konformasiyasına çevirir.

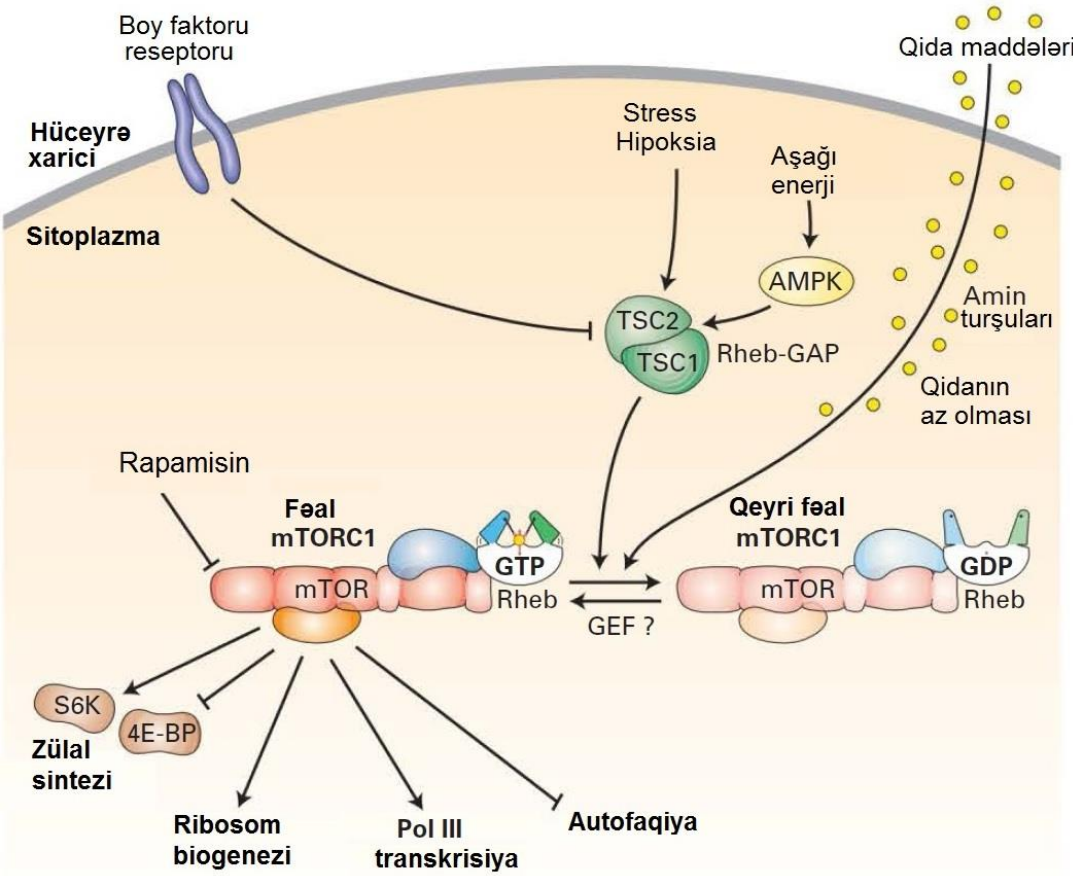
TSC1/TSC2 Rheb-GAP-in fəallığı bir neçə gedişlə tənzimlənir və hüceyrəyə zülal sintezinin ümumi gedişinə nəzarət etmək üçün hüceyrənin müxtəlif siqnal yollarına inteqrasiya etməsinə imkan verir. Boy faktorlarının hüceyrə səthi reseptorlarından alınan siqnallar TSC1/TSC2-nin ingibitor saytlarında fosforlaşmasına və beləliklə Rheb-GTP-nin artmasına və mTORC1 kinaza fəallıyyətinin fəallaşmasına səbəb olur. Hüceyrə səthi reseptorları vasitəsilə bu tip tənzimləmə hüceyrənin çoxalmasına və inkişafına olan nəzarəti hüceyrə-hüceyrə qarşılıqlı əlaqələri vasitəsi ilə nəzarət olunan inkişaf prosesləri ilə əlaqələndirir.

Hüceyrənin çoxalması üçün qida enerjisi kifayət etmədikdə, AMP qatılığına nisbətdə ATP qatılığının azalması AMP ilə fəallaşan kinaza (AMPK) tərəfindən aşkar olunur. Fəallaşan AMPK TSC1/TSC2-ni fəallaşma mərkəzlərində fosforlaşdıraraq Rheb-GAP fəallığını stimullaşdırır və nəticədə mTORC1 kinaza fəallığını və translyasiyanın qlobal sürətini ingibirləşdirir. Hipoksia və başqa hüceyrə stressləri də həmçinin TSC1/TSC2 Rheb-GAP fəallığını artırır.

mTORC1-in fəallaşması mTORC1-in lizosomlarla tənzimlənə bilən assosasiyasından asılıdır. Hüceyrədə Rheb-lərin çoxu lizosomların xarici membranı ilə assosasiyada olur və Rheb•GTP-nin mTORC1 ilə assosasiyasına kömək edən başqa zülallar xarici lizosomal membranla məhdudlaşırlar. Əvvəllər qeyd edildiyi kimi, mTORC1 fəallığının tənzimlənməsi amin turşularının lizosomlarda qatılığı ilə nəzarət olunur. Bunun baş verdiyi mexanizm fəal tədqiqat sahələrindən biridir.

mTORC1-dən fərqli olaraq mTORC2 qidalanmaya qarşı qeyri həssasdır. Amma, mTORC2 insulinin karbohidrat sorulmasını və metabolizmini tənzimləyən insulin reseptoruna birləşməsi ilə fəallaşır (bax Bölmə 16.8). mTORC2 proteinkinaza B-ni (həmçinin Akt adlanır) (bax Şəkil 16-29), proteinkinaza C-ni (bax Fəsil 15.6) və zərdab-qlikokortikoidlə-induksiya olunan proteinkinaza 1-i (SGK1) fosforlaşdıraraq fəallaşdırır. Bu proteinkinazalar, öz növbəsində aktin sitoskeleti

tənzimləməklə metabolizmi, apoptozu və hüceyrə formasını tənzimləyir (bax Fəsil 17).



ŞƏKİL 10-32 mTORC1 yolu. mTORC1 Rheb kompleksl̇ə birləşəndə və GTP ilə assosasiyada olan fəal protein-kinaza olur (*aşağıda solda*). Əksinə, mTORC1 GDP ilə assosasiyada olan Rheb ilə kompleksdə birləşəndə qeyri fəal olur (*aşağı sağda*). Fəal olanda, TSC1/TSC2 Rheb-GTPaza fəallaşdıran zülal (Rheb-GAP) Rheb-birləşən GTP-nin GDP-yə hidrolizinə səbəb olur və bununla da mTORC1-i fəalsızlaşdırır. TSC1/TSC2 Rheb-GAP hüceyrənin enerji yükü aşağı olarkən və hüceyrənin digər stress siqnallara cavabı zamanı MAP-kinaza (AMPK) ilə fosforlaşaraq fəallaşır (oxlar). Hüceyrə-səthi boy faktorları reseptorları vasitəsi ilə fəallaşan siqnal-ötürülməsi yolları TSC1/TSC2-də fəalsızlaşma saytlarının fosforlaşmasına və onun GAP fəallığının ingibirləşməsinə səbəb olur. Bu səbəbdən, onlar hüceyrə Rheb-inin böyük fraksiyasını, mTORC1 proteinkinaza fəallığını fəallaşdıran GTP konformasiyasında buraxırlar. Aşağı qida qatılığı da Rheb GTPaza fəallığını, TSC1/TSC2-ni tələb etməyən mexanizmlə tənzimləyir. Fəal mTORC1 4E-BP-ni fosforlaşdırır, onun eIF4E-ni buraxmasına və translysiyanın inisiasiyasının stimullaşmasına səbəb olur. O həmçinin S6 kinazanı (S6K) fosforlaşdırır, oz mövbəsində ribosomal zülalları fosforlaşdıraraq translysiyanı stimullaşdırır. Fəallaşan mTORC1 RNT polimeraza I, II və III üçün transkripsiya faktorlarını da fəallaşdırır, ribosomların, tRNT-lərin və translysiya faktorlarının sintezinə və toplanmasına səbəb olur. mTORC1 fəallığı olmayanda, bu proseslərin hamısı ingibirləşir. Əksinə, fəallaşmış mTORC1, hüceyrədə qeyri fəal mTORC1 ilə fəallaşan avtofaqiyanı ingibirləşdirir. Bax S. Wullschieger et al., 2006, *Cell* **124**:471.

İnsanda TORC1 yolunun komponentlərini kodlaşdıran genlər çoxsaylı xərçəng xəstəliklərində mutasiya olunur, nəticədə hüceyrənin çoxalması böyüyüb artma siqnalı olmadan baş verir. TSC1 və TSC2 (bax Şəkil 10-32) ilkin olaraq insanın nadir genetik sindromu tuberozis skleroz kompleksində birinin və ya digərinin mutant olmasına görə identifikasiya olunmuşlar. Bu xəstəliyə tutulmuş xəstələrdə müxtəlif toxumalarda xoşxassəli şişlər inkişaf edir. Bu xəstəlik ona görə əmələ gəlir ki, TSC1 və ya TSC2-nin fəalsızlaşması TSC1/TSC2 heterodimerin Rheb-GAP fəallığının itməsinə səbəb olur, nəticədə Rheb-GTP-nin qeyri-normal şəkildə yüksək və tənzimlənə bilməyən səviyyəsi və bunun nəticəsində tənzimlənməyən mTOR fəallığı yaranır. Hüceyrə səthi reseptorları ilə siqnal ötürülməsi yollarının komponentlərində TSC1/TSC2 Rheb-GAP fəallığının ingibirləşməsinə səbəb olan mutasiyalar insan şişləri üçün ümumi haldır və hüceyrənin bölünməsi və proliferasiyası üçün normal siqnal olmadıqda belə hüceyrənin bölünməsinə və artmasına kömək edir. Şişlərdə yüksək mTORC1 proteinkinaza fəallığı pis kliniki proqnozlarla korrelyasiya edir. Nəticədə, mTOR ingibitorlar, hal-hazırda xərçəngə qarşı müalicədə terapiyanın başqa modelləri ilə birlikdə onların effektivliyini yoxlamaq üçün kliniki sınaqlarda istifadə olunur. Rapamisin və quruluşuna görə ona oxşar olan başqa mTORC1 ingibitorlar immun cavab reaksiyalarında güclü təsirə malik olan repressorlardır, çünki onlar xarici antigenlərə qarşı T limfositlərin fəallaşmasını və replikasiyasını ingibirləşdirirlər (bax Fəsil 23). Bir sıra viruslar virus

yoluxmasından dərhal sonra mTORC1-i fəallaşdıran zülalları kodlaşdırırlar. Nəticədə translyasiyanın baş verən stimullaşması by hüceyrə parazitlərinə aşkar selektiv üstünlük verir.

eIF2 Kinazalar eIF2 kinazalar da hüceyrənin zülal sintezinin qlobal səviyyəsinin tənzimlənməsi üçün tələb olunur. Şəkil 5-23-də göstərildiyi kimi, translyasiyanın inisiasiyası faktoru eIF2 yüklənmiş inisiator tRNT-ni ribosomun kiçik subvahidinin P saytına gətirir. eIF2 **trimer G zülaldır** və ona görə də ya GTP-birləşmiş ya da GDP-birləşmiş konformasiyalarda mövcud olur. eIF2-nin yalnız GTP-birləşmiş forması yüklənmiş inisiator tRNT-yə birləşmək və ribosomun kiçik subvahidi ilə bağlanmaq qabliyyətinə malikdir, sonra o, eIF4E subvahidi vasitəsi ilə mRNT-nin 5′ papağına birləşmiş eIF4 komplekslə qarşılıqlı əlaqəyə girir. Kiçik ribosomal subvahid sonra, mRNT-ni 3′ istiqamətində aşağıya doğru **AUG** inisiator kodonunu tapana qədər skan edir və bu kodon **P** saytındakı tRNT ilə əsas cütü əmələ gətirir. Bu baş verdikdə, eIF2 ilə birləşmiş GTP GDP-yə hidroliz olunur və nəticədə əmələ gələn eIF2•GDP kompleks azad olur. GTP-nin hidrolizi geriyə dönməyən "proofreading" ("korrektura") addımı ilə nəticələnir və bu addım kiçik ribosom subvahidini yalnız inisiaiator tRNT onun P saytına düzgün birləşdikdə və AUG start kodonu ilə düzgün əsas cütü əmələ gətirdikdə böyük subvahidlə birləşməyə hazır edir. eIF2 başqa bir inisiasiya dövrəsində iştirak etməzdən öncə, ona birləşmiş GDP GTP ilə əvəz olunmalıdır. Bu proses, eIF2-yə spesifik quanin nukleotidi mübadiləsi faktoru (GEF) olan translyasiyanın inisiasiyası faktoru eIF2B ilə kataliz olunur.

Stress keçirən hüceyrələrdə ümumi zülal sintezini ingibirləşdirmək üçün qlobal mexanizmə eIF2-nin α subvahidinin spesifik serin qalıqlarında fosforlaşması daxildir. Bu saytların fosforlaşması eIF2-nin zülalların sintezindəki fəaliyyətinə bilavasitə mane olmur. Əksinə, fosforlaşmış eIF2, eIF2-quanin nukleotidi mübadiləsi faktoru eIF2B-yə qarşı yüksək affinliyə malik olur, eIF2B fosforlaşmış eIF2-ni buraxa bilmir, nəticədə onun əlavə eIF2 faktorların GTP mübadiləsini kataliz etməsi blok olunur. eIF2-nin miqdarı eIF2B-yə nisbətən daha çox olduğundan, eIF2-nin müəyyən bir hissəsinin fosforlaşması, bütün hüceyrə eIF2B-lərin ingibirləşməsi ilə nəticələnir. Qalan eIF2-lər, zülalın sintezində iştirak edə bilməyən GDP-birləşmiş formada toplanırlar, beləliklə hüceyrənin bütün zülal sintezini ingibirləşdirirlər. Amma, bəzi mRNT-lər, eIF2-nin fosforlaşması nəticəsində yaranan eIF2-GTP-nin aşağı qatılığında translyasiyanın inisiasiyasına imkan verən 5′ rayonlara malikdirlər. Bu mRNT-lər sırasına, hüceyrədə stress nəticəsində denaturasiya olunmuş hüceyrə zülallarının yenidən bükülməsində fəaliyyət göstərən çaperon zülallarının, stresin öhdəsindən gəlmək üçün hüceyrəyə kömək edən başqa zülalların və streslə-induksiya olunan bu zülalları kodlaşdıran genlərin transkripsiyasını fəallaşdıran transkripsiya faktorlarının mRNT-ləri daxildirlər.

İnsan hüceyrələri dörd eIF2 kinazanı ekspressiya edir, bunların hamısı eyni ingibitor eIF2α serini fosforlaşdırır. Bu kinazaların hər biri, müxtəlif tipli hüceyrə stresləri ilə tənzimlənir və hər biri zülal sintezini ingibirləşdirərək, adətən inkişaf edən hüceyrələrdə stresə cavab vermək üçün istifadə edilən zülal sintezinə ayrılan hüceyrə resurslarının böyük bir fraksiyasını başqa istiqamətlərə yönəltmək üçün hüceyrələrə imkan verir.

GCN2 (***g***eneral ***c***ontrol ***n***on-derepressible 2) eIF2 kinaza yüksüz tRNT-lərə birləşməklə fəallaşır. Hüceyrələr amin turşuları aclığına məruz qaldıqda yüklənməmiş tRNT-lərin qatılığı artır, GCN2 eIF2-kinaza fəallığını artırır və zülal sintezini güclü şəkildə ingibirləşdirir.

Zülallar endoplazmatik şəbəkəyə (ER) daxil olarkən, ER lümeni mühitinin anormallığı üzündən düzgün bükülmədikdə PEK (pankreatik eIF2 kinaza) fəallaşır. PEK-in induktorları sırasına ER-də çox zülalların qlikozilləşməsini ingibirləşdirən anormal karbohidrat qatılığı daxildir. Çox ER zülallarının düzgün bükülməsi üçün tələb olunan ER çaperonunun fəalsızlaşdırıcı mutasiyaları (bax Fəsil 13 və 14) PEK-in fəallaşmasına da səbəb olur.

Hemlə-tənzimlənən ingibitor (HRI), qlobin zülalların sintezinin sürətini təmin etmək üçün hem prostetik qrupun təchizatı çox aşağı olan zaman inkişafda olan qırmızı qan hüceyrələrindəki fəallaşmış eIF2 kinazadır. Bu cürə mənfi geriyə əlaqə qlobin zülalların sintezinin sürətini hem sintezinin sürətinə uyğun olana qədər aşağı salır. Oksidativ stresə və ya istilik şokuna cavab zamanı HRI başqa tip hüceyrələrdə də fəallaşır.

Nəhayət, RNT ilə fəallaşan protein kinaza (PKR) təxminən 30 əcac cütündən uzun olan iki-zəncirli RNT-lərlə fəallaşır. Normal şərait altında məməlilərin hüceyrələrində bu cürə iki-zəncirli RNT-lər yalnız virus yoluxmaları zamanı istehsal olunur. İki-zəncirli RNT-lətin uzun rayonları RNT virusların replikasiya intermediatları kimi yaranır ya da DNT virus genomunun hər iki zəncirindən transkripsiya olunan komplementar RNT rayonlarının hibridləşməsindən yaranır. Zülal sintezinin ingibirləşməsi yeni nəsil virionların yaranmasına mane olur, qonşu hüceyrələri yoluxdurmaqdan mühafizə edir. Maraqlıdır ki, adenoviruslar PKR-ə qarşı mudafiəni yaradıb inkişaf etdirmişlər: onlar çox böyük miqdarda, 160 nukleotid uzunluqda, iki-zəncirli sancaq rayonlara malik olan virusla-assosasiya olunmuş (VA) RNT-ni ekspressiya edirlər. VA RNT-nin transkripsiyası RNT polimeraza III ilə aparılır və nüvədən pro-miRNT-lərin eksportini olan Eksportin 5 vasitəsi ilə eksport olunur (bax Şəkil 10-29). VA RNT yüksək afinnliklə PKR-ə birləşir, onun proteinkinaza fəallığını ingibirləşdirir və VA genin silindiyi (delesiya olunduğu) mutant adenovirusla yoluxmuş hüceyrələrdə müşahidə olunan zülal sintezinin ingibirləşməsinə mane olur.

Ardıcıllıq-Spesifik RNT-birləşdirən Zülallar Spesifik mRNT Translyasiyasına Nəzarət Edir

Bizim yenicə təsvir etiyimiz qlobal mRNT tənzimlənməsindən fərqli olaraq, müəyyən spesifik mRNT-lərin translyasiyasının nəzarət olunması üçün başqa mexanizmlər də yaranmışdır. Bir qayda olaraq bu mexanizmlər, mRNT-də xüsusi quruluşa və ya ardıcıllığa birləşən ardıcıllıq-spesifik RNT-birləşdirən zülallarla baş verir. Belə zülallar mRNT-nin 5′ UTR-na birəşəndə, ribosomun kiçik subvahidinin birinci inisiasiya kodonuna qədər skan etmək qabliyyəti blok olunur və translyasiyanın inisiasiyası ingibirləşir. Başqa rayonlara birləşmə, mRNT parçalanmasını ya gücləndirir ya da ingibirləşdirir.

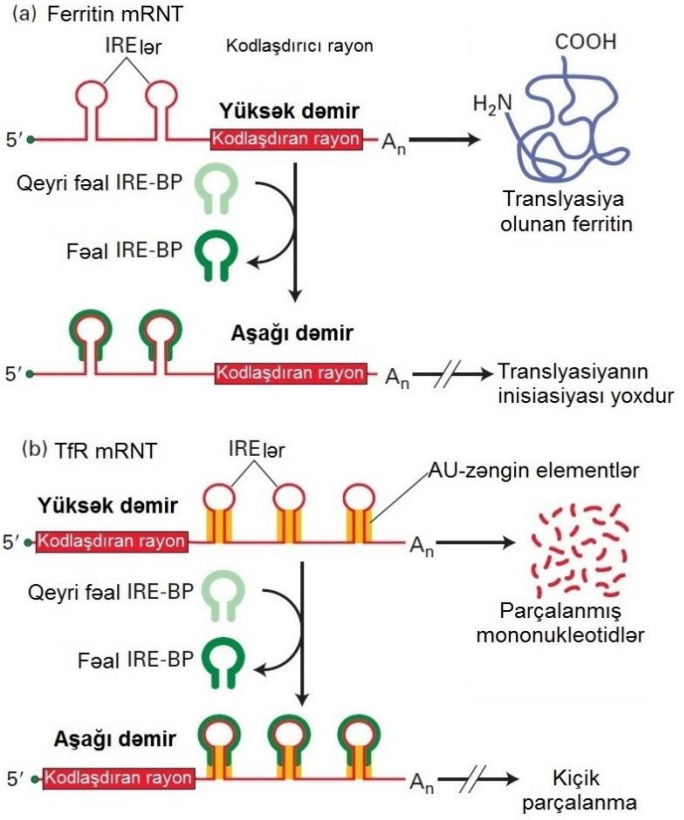
Dəmirə cavab elementi-birləşdirən zülalla (*iron responce element-binding protein – IRE-BP*) hüceyrədaxili ion qatılığına

nəzarət, eyni zülalla bir mRNT-nin translyasiyasının, digərinin isə parçalanmasının tənzimlənməsi sisteminin gözəl bir nümunəsidir. Hüceyrədə dəmir ionlarının qatılığının dəqiq tənzimlənməsi hüceyrə üçün kritik əhəmiyyət kəsb edir. Limon turşusu tsiklinin fermentləri (bax Şəkil 12-16), eləcə də mitoxondri və xloroplastlarda ATP sintezində iştirak edən kompleksdəki elektron nəqliyyatı zülalları kimi çoxsaylı fermentlər və zülallar kofaktor kimi Fe^{2+} malikdirlər (bax Fəsil 12). Digər tərəfdən, Fe^{2+}-in artıqlığı hüceyrə makromolekulları ilə reaksiyaya girib onu zədələyən sərbəst radikalları əmələ gətirir. Hüceyrədaxili dəmir ehtiyatı aşağı olanda, hüceyrədə dəmirin miqdarını artıran ikili-nəzarət sistemi fəaliyyət göstərir, dəmirin miqdarı artıq olduqda isə sistem dəmirin sərbəst ionlarının toksik səviyyədə toplanmasına mane olan istiqamətdə fəaliyyət göstərir.

Bu sistemin bir komponenti, dəmirə birləşib onun artıq hissəsini ehtiyat saxlayan hüceyrədaxili dəmir-birləşdirən **ferritin** zülalının istehsalının tənzimlənməsidir. Ferritin mRNT-nin 5′ UTR-ı dəmirə cavab-elementlərinə (IRE) malikdir, bunun da sütun-ilgək quruluşu vardır. IRE-BP IRE ilgəklərdə beş spesifik əsası və "sütunun" dupleks xüsusiyyətini tanıyır. Dəmirin aşağı qatılığında, IRE-BP IRE-lərə birləşən fəal konformasiyada olur (Şəkil 10-33a). Birləşmiş IRE-BP ribosomun kiçik subvahidinin AUG start kodon üçün skan etməsini blok edir (bax Şəkil 5-23), bununla da translyasiyanın inisiasiyasını ingibirləşdirir. Nəticədə alınan ferritinin azalması göstərir ki, daha az dəmir ferritinlə kompleksdə birləşmiş olur, ona görə də dəmir tələb edən fermentlər üçün daha çox dəmir əldə etmək mümkün olur. Dəmirin yüksək qatılığında, IRE-BP 5′ IRE-lərə birləşməyən qeyri fəal konformasiyada olur, beləliklə translyasiyanın inisiasiyası baş verə bilir. Yeni sintez olunmuş ferritin sonra sərbəst dəmir ionları ilə birləşir və onların ziyanverici miqdarda toplanmasına mane olur.

Bu tənzimləyici sistemin başqa bir hissəsi dəmirin hüceyrə daxilinə daşınmasına nəzarət edir. Onurğalılarda, udulmuş dəmir, transferrin adlanan zülala birləşmiş şəkildə dövrəedici sistem vasitəsi ilə daşınır. Plazma membranda transferrin reseptora (TfR) birləşdikdən sonra, transferrin-dəmir kompleksi reseptor-vasitsilə endositoz yolu ilə hüceyrə daxilinə keçir (bax Şəkil 14-31). TfR mRNT-nin 3′ UTR rayonu, sütununda AU-zəngin destabilləşdirici ardıcıllıqlar olan IRE-lərə malikdir (Şəkil 10-33b). Dəmirin yüksək qatılığında, IRE-BP qeyri fəal, birləşməyən konformasiyada olduqda, bu AU-zəngun ardıcıllıqlar TfR mRNT-nin parçalanmasını, əvvəllər təsvir olunduğu kimi, başqa qısa ömürlü mRNT-lərin tez şəkildə parçalanmasına səbəb olan eyni mexanizmlə təşviq edir. Nəticədə, transferrin reseptorun istehsalının azalması dəmirin importunun sürətlə azalmasına səb olur, beləliklə hüceyrəni dəmirin artıqlığından mühafizə edir. Amma, dəmirin aşağı qatılığında, IRE-BP fəal olur və TfR mRNT-də 3′ IRE-lərə birləşə bilir. Birləşmiş IRE-BP destabilləşdirici AU-zəngin elementlərin, əks halda mRNT-ləri tez bir şəkildə parçalayan zülallar tərəfindən tanınmasına mane olur. Nəticədə, transferrin reseptorun istehsalı artır və daha çox dəmir hüceyrə daxilinə keçirilir.

Başqa tənzimlənən RNT-birləşdirən zülallar spesifik mRNT-lərin translyasiyasının və ya parçalanmasının eyni üsulla nəzarət olunmasında fəaliyyət göstərirlər. Məsələn, hemə-həssas RNT-birləşdirən zülal, hemin sintezində əsas ferment olan aminolevulinat (ALA) sintazanı kodlaşdıran mRNT-nin translyasiyasına nəzarət edir. Buna bənzər olaraq, in vitro tədqiqatlar göstərdi ki, süd zülalı kazeini kodlaşdıran mRNT prolaktin hormonu ilə stabilləşir, prolaktin olmadığı halda isə o tez bir şəkildə parçalanır.



ŞƏKİL 10-33 mRNT translyasiyasının və parçalanmasının dəmirdən-asılı olan tənzimlənməsi. Dəmirə cavab elementi-birləşdirən zülal (*iron responce element-binding protein* – IRE-BP) (a) ferritin-mRNT-nin translyasiyasına və (b) transferin reseptor (TfR) mRNT-nin parçalanmasına nəzarət edir. Hüceyrədaxili dəmir ionlarının aşağı qatılığında, IRE-BP, bu mRNT-lərin 5′ və ya 3′ UTR rayonlarında dəmirə cavab elementlərinə (IRE-lər) birləşir. Dəmir ionlarının yüksək qatılığında, IRE-BP konformasiya dəyişikliyinə uğrayır və heç bir mRNT-yə birləşə bilmir. IRE-BP ilə ikili-nəzarət, hüceyrə daxilində dəmir ionlarının səviyyəsini dəqiqliklə tənzimləyir. Müzakirə üçün tekstə bax.

Nəzarət mexanizmi Düzgün Prosess Olunmamış mRNT-lərin Translyasiyasına Mane Olur

Düzgün prosess olunmamış mRNT-lərin translyasiyası, genin normal fəaliyyətinə mane olan anormal zülalların istehsalına səbəb ola bilir. Bu effekt, Fəsil 6-də müzakirə olunan dominant-mənfi mutasiyalar nəticəsində alınan effektə ekvivalentdir (Şəkil 6-41). Ümumilikdə mRNT nəzarəti adlanan bir sıra mexanizmlər hüceyrəyə düzgün prosess olunmamış mRNT molekullarının translyasiyasından yan keçməyə kömək edir. Biz əvəllər bu cürə iki nəzarət mexanizmlərini qeyd etmişdik: düzgün prosess olunmamış mRNT-lərin nüvədə tanınması və onların eqzosomlarla parçalanması; snRNP-lərlə assosasiya

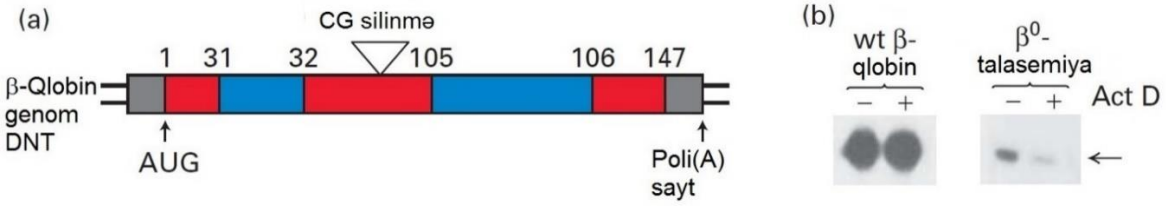
olunmuş vəziyyətdə olan düzgün splays olunmamış pre-mRNT-lərin nüvədən eksport olunmasına ümumi məhdudiyyətin qoyulması.

Nonsens-vasitəsilə dağılma (NMD) adlanan digər nəzarət mexanizmi bir və ya daha artıq eqzonun düzgün splays olunmadığı mRNT-lərin parçalanmasına səbəb olur. Belə düzgün getməyən splaysinq çox hallarda mRNT-lərdə 3′-də açıq oxunan çərçivəni səhv eqzon-eqzon qovşaqları ilə dəyişir, nəticədə çərçivədən-kənar missens mutasiyanın daxil edilməsinə və səhv stop kodonun yaranmasına səbəb olur. Demək olar ki, bütün düzgün splays olunmuş mRNT-lərdə stop kodon axırıncı eqzonda yerləşir. Nonsens-vasitəsilə dağılma prosesi çox hallarda, mRNT-də sonuncu eqzon-eqzon qovşağından öncə ortaya çıxan stop kodona malik olan mRNT-lərin tez bir şəkildə parçalanması ilə nəticələnir, əksər hallarda belə mRNT-lər RNT splaysinqində baş verən səhvlər nəticəsində yaranır. Amma NMD, gen daxilində stop kodon yaradan mutasiyanın nəticəsində və ya çərçivə-sürüşməsi, delesiyası və ya insersiyası nəticəsində də yarana bilir. NMD, ilkin olaraq, aşağı səviyyədə β-qlobin mRNT ilə bağlı olan β-qlobin zülallarını istehsal edən β^0-talasemiya xəstələrin müayinəsi zamanı aşkar olunmuşdur (Şəkil 10-34).

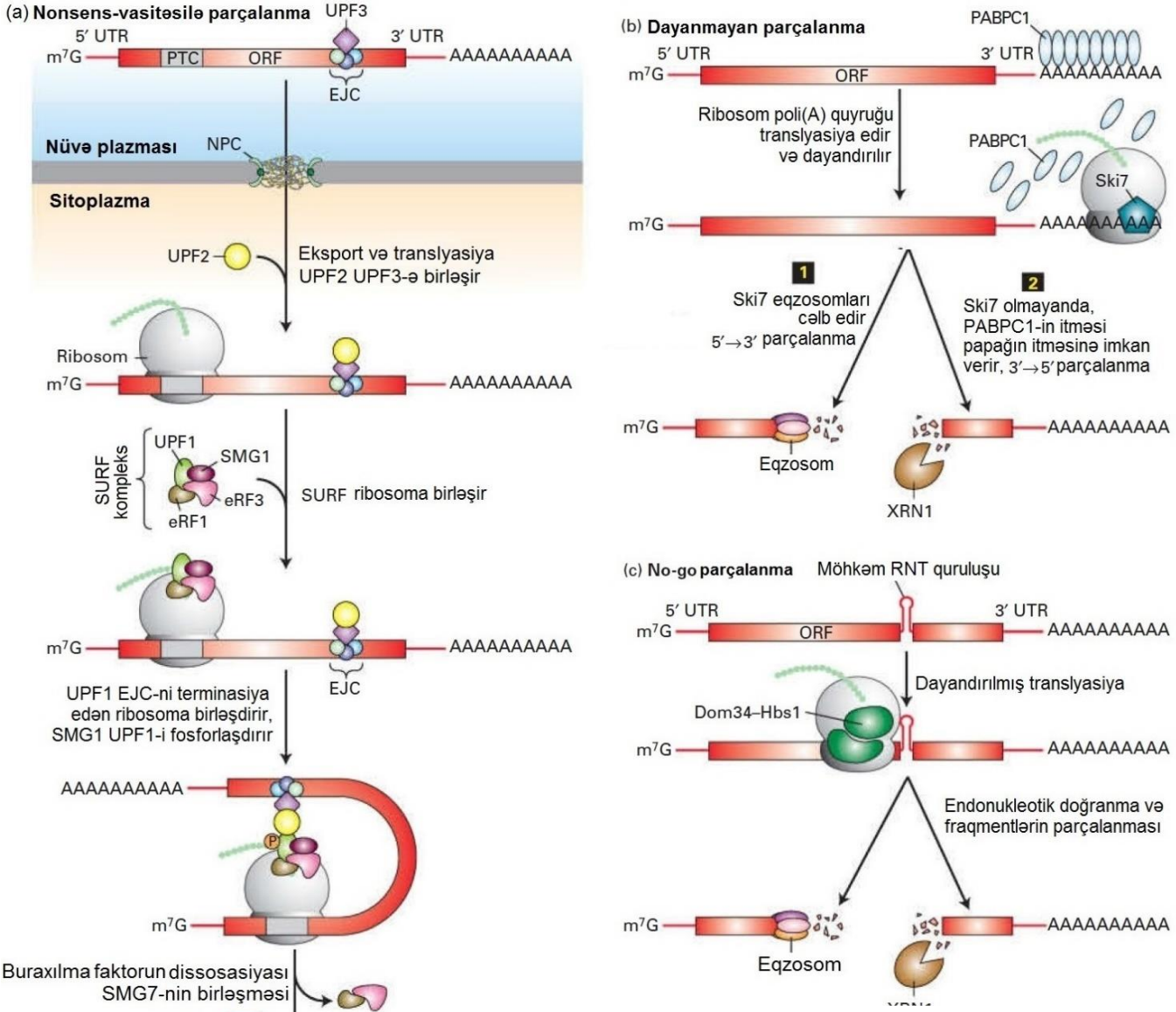
Prosess olunmuş mRNT-də eqzon-eqzon qovşaqların vəziyyətini göstərə bilən, mümkün olan molekulyar siqnalların axtarılması eqzon-qovşaq komplekslərinin aşkar olunmasına səbəb oldu. Artıq göstərildiyi kimi, bir sıra zülalların (o cümlədən, Y14, Magoh, eIF4IIIA, UPF2, UPF3 və REF) kompleksləri, RNT splaysinqinin ardınca, eqzon-eqzon qovşağından təxminən 20 nukleotidə 5′ istiqamətdə birləşir və mRNT eksporterlə qarşılıqlı əlaqəyə girərərək mRNP-lərin nüvədən eksportunu stimullaşdırır (bax Şəkil 10-23). Maya mutantlarının analizləri göstərdi ki, eqzon-qovşaq komplekslərində (UPF3) zülallardan biri nonsens-vasitələnən dağılmada fəaliyyət göstərir. Sitoplazmada, UPF3 zülalla və onu fosforlaşdıran protein kinaza (SMG1) ilə qarşılıqlı əlaqəyə girir, mRNT-nin P cismlə assosasiyasına (birləşməsinə) səbəb olur və mRNT-nin translyasiyasını repressiya, parçalanmasını isə induksiya edir. Eqzon-qovşaq kompleksinə birləşmiş əlavə bir zülal (UPF2) P cismlə assosasiyada olan deadenilaza kompleksi ilə birləşir, birləşdiyi mRNT-də poli(A) quyruğu tez bir şəkildə uzaqlaşdırır, ondan papağın sürətlə itməsinə və onun P cismlə birləşmiş 5′→3′ eqzoribonukleaza XRN1 ilə sürətlə parçalanmasına səbəb olur (bax Şəkil 10-24). Düzgün splays olunmuş mRNT-lər olan halda, nüvə papaq-birləşdirən komplekslə assosasiyada olan mRNP eksporter nüvə məsamələri kompleksindən keçərək eksport olunurlar, bununla da mRNT-ni parçalanmaqdan mühafizə etdilər. Guman olunur ki, mRNT-ni translyasiya etmək üçün ilk "pioner" ribosomun keçməsi ilə eqzon-qovşağı kompleksləri mRNT-dən sıxışdırılıb çıxarılır. Amma, sonuncu eqzon-eqzon qovşağından öncə gələn stop kodona malik olan mRNT-lərdə, bir və ya daha artıq eqzon-qovşağı kompleksləri mRNT ilə birləşmiş vəziyyətdə qalır və nonsens-vasitələnən dağılma ilə nəticələnir (Şəkil 10-35a). Alternativ mexanizmlər, vaxtından əvvəl yetişməmiş poliadenilləşən (*dayanacaqsız- parçalanma*) (Şəkil 10-35b), və ya zədələnmiş əsaslara malik olan və ya mRNT boyu ribosomal translokasiyaya mane olan stabil ikinci quruluşlara (*no-go parçalanma*) malik olan (Şəkil 10-35c) mRNT-lərin translyasiyasının və parçalanmasının ingibirləşməsinə səbəb olur.

mRNT-lərin Lokalizasiyası Sitoplazmanın Xüsusi Rayonları Daxilində Zülalların İstehsalına İmkan Verir

Çoxsaylı hüceyrə prosesləri xüsusi zülalların hüceyrənin xüsusi spesifik quruluşlarında və ya rayonlarında yerləşməsindən asılıdır. Sonrakı fəsillərdə biz, bəzi zülalların onların sintezindən *sonra* düzgün hüceyrə nahiyələrinə necə daşındıqlarını öyrənirik. Alternativ olaraq, zülalların yerləşməsi mRNT-lərin, onların kodlaşdırdığı zülalların fəaliyyət göstərdiyi sitoplazmanın spesifik rayonlarında yerləşməsini təyin etməklə əldə etmək olar. Əksər hallarda, bu vaxta qədər baxılmış bu cürə mRNT lokalizasiyaları mRNT-nin 3′ UTR-dakı ardıcıllıqları ilə müəyyən edilirdi. Son zamanlar, *Drosophila* rüşeymində mRNT yerləşməsinin genom-səviyyəsində tədqiqatı aşkar etdi ki, analiz olunan 3000 mRNT-nin təxminən 70 faizi spesifik subhüceyrə rayonlarında yerləşir, bu mRNT-nın lokalizasiyasının əvvəlcədən qiymətləndiriləndən daha çox ümumi bir fenomen olduğu ehtimalını artırır.



ŞƏKİL 10-34 Nonsens-vasitəsilə mRNT dağılmasının (NMD) aşkar olunması. (a) β^0-talasemiyalı xəstələri çox aşağı səviyyədə β-qlobin mRNT-ni ekspressiya edirlər. Bu sindromun ümumi səbəbi β-qlobin genin 1-ci eqzonunda və ya 2-ci eqzonunda bir əsas cütünün silinməsidir (delesiyasıdır). Mutant mRNT-ni translyasiya edən ribosom silinmədən sonra çərçivəni oxuyub keçir və mRNT-də sonuncu eqzon qovşağına qədər tam translyasiya etmədən yanılış oxunma çərçivəsində stop kodonla qarşılaşır. Nəticədə, onlar mRNT üzərində eqzon-qovşağı kompleksini (EJC) tərk edirlər. Sitoplazmatik zülallar EJC ilə assosasiya edir və mRNT-nin parçalanmasını induksiya edir. (b) Sümük iliyi təbii β-qlobin geni olan xəstədən və β^0-talasemiyalı xəstələrdən alınmışdır. mRNT sümük iliyi əldə olunan kimi ondan və onu 30 dəqiqə müddətində, transkripsiyanı ingibirləşdirən Aktinomisin D olan mühitdə inkubasiya etdikdən sonra ayrılmışdır. β-qlobin RNT-nin miqdarı, S1 nukleaza müdafiə metodundan istifadə etməklə (ox) ölçülmüşdür. β^0-talasemiyalı xəstə təbii β-qlobin genli xəstələrlə müqayisədə çox az β-qlobin mRNT-yə malik olmuşdur (–Act D). Transkripsiyası ingibirləşəndə mutant β-qlobin mRNT (+Act D) sürətlə dağıldığı halda, təbii formalı β-qlobin mRNT stabil qalır. [(b) hissəsi Elsevier razılığı ilə Maquat, L.E., et al., "Unstable β-globin mRNA in mRNA-deficient β0 thalassemia," *Cell*, 1981, **27**(3 Pt2):543–53 –dən yenidən çap olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc. vasitəsilə alınmışdır]



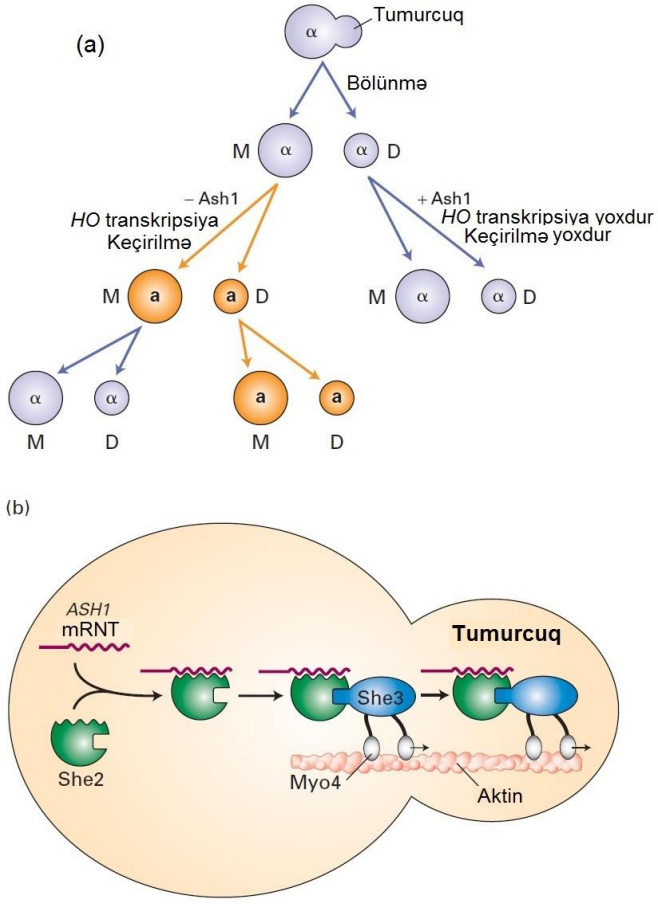
ŞƏKİL 10-35 Sitoplazmada RNT-nin nəzarət mexanizmləri. (a) Nonsens-vasitəsilə parçalanma. PTC = vaxtından əvvəl terminasiya (stop) kodonu; SURF kompleksi = SMG1, UPF1 proteinkinazaların və eRF1 və eRF3 riliz faktorların kompleksi. SURF kompleksin əmələ gəlməsi UPF1-in SMG1 ilə fosforlaşmasına səbəb olur. Fosforlaşmış UPF1, məlumatı translyasiya etmək üçün birinci pioneer ribosomla mRNT-dən sıxışdırılıb çıxarılmamış istənilən eqzon-eqzon qovşağı komplekslərinə birləşmiş UPF2-UPF3 komplekslə assosasiya edir. Bu asosasiya PTC-ə malik olan mRNT-nin P cismlərlə assosasiyasına, polli(A) quyruğun uzaqlaşdırılmasına və mRNT-nin parçalanmasına səbəb olur. (b) Dayanacaqsız (non-stop) parçalanma. Yetişməkdən öncə kəsilmiş və poliadenilləşmiş mRNT-lərin poli(A) quyruqdan öndə stop kodonları olmur. Bu cürə mRNT-lər translyasiya olunanda, ribosom poli(A) quyruğu translyasiya edir və anormal mRNT-nin 3′ ucunda dayanır, çünki riliz faktorların eRF1 və eRF3-ün ribosomun A saytına birləşməsi (bax Şəkil 5-26) üçün tələb olunan stop kodon yoxdur. Ali eukariotlarda Ski7 faktoru dayandırılmış ribosoma birləşir və anormal RNT-ni parçalayan sitoplazmatik eqzosomu cəlb edir (pillə 1). Alternativ olaraq, *S. cerevisiae*-də (pillə 2), PABPC1-in yerinin poli(A) quyruqdan elonqasiya edən ribosom vasitəsilə dəyişilməsi papağın atılmasına və XRN1 eqzonukleaza vasitəsilə 5′→3′ parçalanmaya səbəb olur. (c) No-go parçalanma. Əgər mRNT-də nukleotid əsası ribosomun orada dayandırılmasına səbəb olan dərəcədə zədələnmişsə və ya əgər düzgün prosess olunmamış mRNT-nin ribosomal elonqasiyanı blok edən, uzun dupleks sütunlu stabil sütun-ilgək rayonu varsa, Dom34-Hsb1 kompleks anormal mRNTyə birləşir və onda endonukleolitik kəsik edir. Bu kəsik 5′ fraqmentdə sərbəst 3′ ucu yaradır və bu sitoplazmatik eqzosom tərəfindən dağıdılır, 3′ fraqmentdə isə sərbəst 5′ ucu yaradır ki, bu da 5′→3′ istiqamətdə XRN1 eqzonukleaza ilə parçalanır. Bax N. L. Garneau, J. Wilusz, and C. J. Wilusz, 2007, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:113.

mRNT-lərin *S.cerevisae*-nin tumurcuqlarında lokalizasiyası

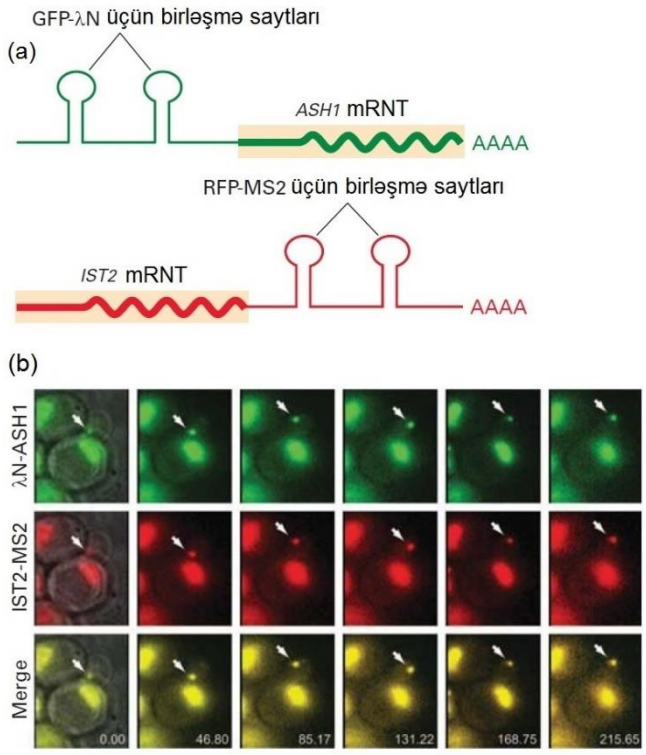
mRNT yerləşməsinin ən çox hərtərəfli başa düşülən nümunəsi tumurcuqlayan maya *S.cerevisae*-dədir. Fəsil 9-da müzakirə olunduğu kimi, haploid maya hüceyrələrinin **a** və ya **α** mutant tipini nümayiş etdirmələri onların **a** və ya **α** genlərinin III xromosomda ekspressiya olunan *MAT* lokusunda mövcud olmaları ilə muəyyən olunur (bax Şəkil 9-35). **a** və ya **α** genlərinin, *sakit cütləşmə* (*silent mating*) tipi lokusundan ekspressiya olunmuş *MAT* lokusuna keçirilməsi HO adlanan ardıcıllıq-spesifik endonukleaza ilə inisiasiya olunur. *HO* genin transkripsiyası SWI/SNF xromatin remodelinq kompleksindən asılıdır (bax Bölmə 9.5). Ana hüceyrədən tumurcuqlama yolu ilə əmələ gələn qız maya hüceyrələri Ash1 (*HO*-nun Asimmetrik sintezi) adlanan transkripsiya repressoruna malik olurlar ki, bu da SWI/SNF kompleksin *HO* geninə cəlb olunmasına mane olur, bununla da onun transkripsiyasının qarşısını alır. Ana hüceyrələrdə Ash1-in olmaması onların *HO* genini transkripsiya etməsinə imkan verir. Nəticədə, ana hüceyrələr cütləşmə tipinə keçirlər, tumurcuqlama yolu ilə əmələ gələn qız hüceyrələr isə keçə bilmirlər (Şəkil 10-36a).

Ash1 zülalı yalnız qız hüceyrələrdə toplanır, çünki onu kodlaşdıran mRNT yalnız qız hüceyrələrdə yerləşir. Yerləşmə prosesi üç zülalın iştirakını tələb edir: She2 (SWI-dən-asılı olan *HO* ekspressiyası üçün), *ASH1* mRNT-də spesifik RNT quruluşunda xüsusi olaraq lokalizasiya siqnalına birləşən RNT-birləşdirən zülal; Myo4, yükü aktin filament boyunca hərəkət etdirən miyozin motor zülalı (bax Fəsil 17); She2 ilə əlaqədə olan, ona görə də *ASH1* mRNT-ni Myo4 ilə əlaqələndirən She3 zülalı (Şəkil 10-36b). *ASH1* mRNT ana hüceyrənin nüvəsində mitozdan öncə transkripsiya olunur. Myo4 ona birləşmiş *ASH1* mRNT ilə birlikdə, ana hüceyrədən tumurcuğa qədər uzanan aktin filamentləri boyunca hərəkət edərək *ASH1* mRNT-ni hüceyrə bölünməzdən öncə böyüməkdə olan tumurcuğa daşıyır.

Ən azı 23 digər mRNT-nin She2/She3/Myo4 sistemi ilə daşındığı tapılmışdır. Bunların hamısı, bir qayda olaraq, 3′ UTR-də She2-nin birləşdiyi RNT lokalizasiya siqnalına malikdirlər. Bu daşınma prosesi canlı hüveyrələrdə, Şəkil 10-37-də göstərilmiş eksperimentlə vizuallaşdırıla bilər. RNT-lər onların nukleotid ardıcıllığına, spesifik ardıcıllıqlara malik olan fərqli sütun-ilgəklərə birləşən bakteriofaq MS2-nin qabıq zülalı və bakteriofaq λN zülalı kimi RNT-birləşdirən zülallar üçün yüksək-affinlikli birləşmə saytlarını daxil etməklə fluoressent nişanlana bilərlər (Şəkil 10-37a). Bu cürə konstruksiya olunmuş mRNT-lər, müxtəlif rənglərdə fluoressensiya verən zülallara qovşaq olunmuş bakteriofaq zülalları ilə birlikdə tumurcuqlayan maya hüceyrələrində ekspressiya olunarkən, belə qovşaq zülallar öz spesifik RNT birləşdirən saytlarına birləşirlər, bununla da müxtəlif rənglərlə birləşmiş saytlara malik olan RNT-ləri nişanlayırlar. Şəkil 10-37b-də göstərilmiş eksperimentdə, *ASH1* mRNT, λN zülala qovşaq olan yaşıl fluoressent zülalın birləşməsi ilə nişanlanmışdır. Eyni nəqliyyat sistemi ilə tumurcuqda lokalizasiya olunmuş digər mRNT, inkişaf etməkdə olan tumurcuğun membran komponentlərini kodlaşdıran *IST2* mRNT, MS2 qabıq zülala qovşaq olunmuş qırmızı fluoressent zülalın birləşməsi ilə nişanlanmışdır. Tumurcuqlamış hüceyrələrin videosu göstərir ki, fərqli nişanlanmış *ASH1* və *IST2* mRNT-lər, yaşıl və qırmızı fluoressent siqnalların qovşağından göründüyü kimi ana hüceyrənin sitoplazmasında çoxsaylı mRNT-lərə malik olan eyni böyük sitoplazmatik RNP zərrəcikdə toplanmışlar. Sonra, RNP zərrəcik təxminən bir dəqiqə müddətində tumurcuğa daşınır

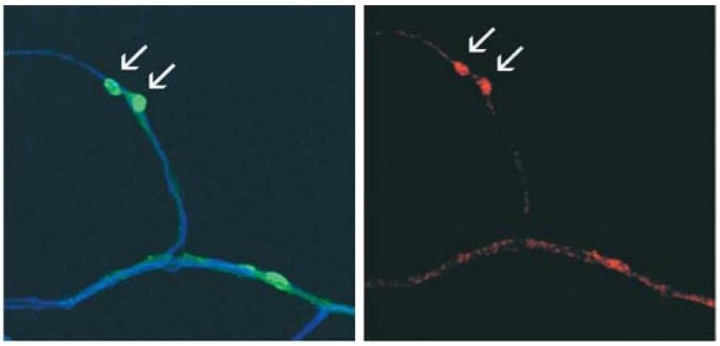


ŞƏKİL 10-36 Haploid maya hüceyrələrinin cütləşmə tipinə keçməsi. (a) Tumurcuqlama forması ilə bölünmə daha böyük ana hüceyrəni (M) və kiçik qız hüceyrəni (D) yaradır, onların hər ikisi orjinal hüceyrə kimi eyni cütləşmə tipinə malikdirlər (bu nümunədə **α**). Ana hüceyrə növbəti hüceyrə tsiklinin G_1 fazasında cütləşən tipə keçə bilir və sonra yenidən bölünərək əks tipin iki hüceyrəsini əmələ gətirir (indiki nümunədə **a**). Başqa formaya keçmə *HO* genin transkripsiyasından asılıdır, bu da yalnız Ash1 zülalı olmayan halda baş verir. Ash1 zülalını istehsal edən daha kiçik qız hüceyrələr başqa cütləşmə tipinə keçə bilmirlər, interfazada inkişaf edərək normal ölçüyə çatdıqdan sonra, onlar ana hüceyrəni və qız hüceyrəni yaratmaq üçün bölünürlər. (b) *S. cerevisiae*-də cütləşmə-tipinin ana hüceyrələrə keçməsinin məhdudlaşdırılması modeli. Ash1 zülal hüceyrəyə *HO* genini transkripsiya etməyə mane olur, bu genin kodlaşdırdığı zülal DNTnin yenidən düzlənməsini inisiasiya edir, bu da cütləşmə tipinin **a**-dam **α**-ya və ya **α**-dam **a** –ya keçməsi ilə nəticələnir. Bu cürə keçmə, yeni tumurcuqlamış qız hüceyrədən ayrıldıqdan sonra yalnız ana hüceyrədə baş verir, çünki Ash1 zülal yalnız qız hüceyrədə olur. Ash1-in belə differensial lokalizasiyasının molekulyar əsası Ash1 mRNT-nin tumurcuğa bir tərəfli daşınmasıdır. Əlaqələndirici zülal She2, *ASH1* mRNT-də spesifik 3′ translyasiya olunmayan ardıcıllığa birləşir, həmçinin She3 zülala birləşir. Bu zülal isə öz növbəsində, miyozin motor Myo4 zülala birləşir, sonuncu isə aktin filament boyunca tumurcuq daxilinə hərəkət edir. Bax S. Koon and b.J. Schnapp, 2001, *Curr.Biology* **11**:R166.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 10-37 mRNP zərrəciklərin maya ana hüceyrələrindən tumurcuqlara daşınması. (a) Maya hüceyrələri, 5′ translyasiya olunmayan rayonunda bakteriofaq λN zülalla birləşmə saytına malik olan *ASH1* mRNT-ləri və 3′ translyasiya olunmayan rayonda bakteriofaqın MS2 qabıq zülalına birləşmə saytına malik olan IST2 mRNT-ləri ekspressiya etmək üçün yaradılmışdır. Yaşıl fluoressent zülalın λN zülalla (GFP- λN) qovşağı və qırmızı fluoressent zülalın MS2 qabıq zülalla (RFP-MS2) qovşğı da eyni hüceyrədə ekspressiya olunmuşdur. Başqa bir eksperimentdə göstərilir ki, bu fluoressent yarlıklanmış (nişanlanmış) ardıcıllıq-spesifik RNT-birləşdirən zülallar, yaradılmış *ASH1* və *IST2* mRNT-lərdə öz spesifik saytlarına birləşirlər, amma biri digərinin birləşmə saytına birləşmirlər. Hər iki fluoressent nişanlanmış zülallar həmçinin nüvə lokalizasiya siqnalına malikdirlər, beləliklə, mRNT-də öz yüksək affinli birləşmə saytlarına birləşməmiş zülallar nüvə məsamələri kompleksindən keçərək nüvəyə daşınmışlar (bax Fəsil 13). Bu pillə sitoplazmada GFP-λN və RFP-MS2-nin yaratdığı fluoressensiyanın artıq hissəsinə mane olmaq üçün lazım idi. (b) Fluoressent hüceyrələrin videosundan kadrlar. GFP-λN və RFP-MS2 bir-birindən asılı olmadan, GFP və RFP-nin millisaniyə dəyişən lazer həyacanlandırmalarından istifadə etməklə vizuallaşdırıldı. Ana hüceyrədə, mikrofotonun ortasına yaxın, böyük vakuoldan sonra gələn nüvə və eləcə də qonşu hüceyrələrin nüvəsi, yuxarı və orta sırada yuxarıda, göstərildiyi kimi, yaşıl və qırməzə fluoressensiya ilə müşahidə olunmuşdur. Iki təsvirin birləşməsi aşağı sırada göstərilmişdir, bu da təsvirlər arasında keçən zamanı göstərir. Həm λN-birləşdirmə saytlarına malik *ASH1* mRNTyə həm də MS2-birləşdirmə saytları ilə *IST2* mRNT-lərə malik olan RNP zərrəciklər, şəkilin sol tərəfindəki sütunda (ox) ana hüceyrənin sitoplazmasında müşahidə olunurlar. Zərrəciklərin intensivliyinin 0.00 ilə 46.8 saniyə arasındakı artması göstərir ki, bu mRNT-lərin çoxu RNP zərrəciklərlə qovuşmuşdur. RNP zərrəciklər, 46.80 və 85.17 saniyələr arasında tumurcuğa daşınmışlar və sonra tumurcuğun ucunda yerləşmişlər. [John Wiley & Sons, Inc. razılığı ilə Lange, S. et al., "Simultaneous transport of different localized mRNA species revealed by live-cell imaging," 2008, *Traffic,* **9**:(8)1256–67 –dan yenidən çap olun ur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc. vasitəsilə alınmışdır. Videonu görmək üçün məqaləyə bax.]

Şəkil 10-37b-də müşahidə olunanlar və ali eukariotların hüceyrələrində daşınan RNT-lərin digər nümunələri kimi böyük sitoplazmatik RNP zərrəciklərin formalaşması RNT birləşdirən zülalda aşağı-mürəkkəbliyi olan amin turşusu ardıcıllıqlarını, məsələn [G/S]Y[G/S] təkrarlardan ibarət olan ardıcıllıqları tələb edir. Belə aşağı mürəkkəbliyə malik olan ardıcılığı olan peptidlər in vitro spontan assosasiya edərək yarımkeçirici geli əmələ gətirirlər. Bu gellər onların daxilindəki serinin fosforlaşması ilə dissosasiya edə bilirlər. Belə komplekslər demək olar ki, mayada aktin kabellərlə və ali eukariotlarda növbəti bölmədə müzakirə olunan neyronlar kimi asimmetrik hüceyrələrdə mikroborucuqlarla daşınan böyük RNP komplekslərin əmələ gəlməsində iştirak edirlər (bax Fəsil 17 və 18). RNP zərrəciklərlə assosasiyada olan RNT-birləşdirən zülallarda belə aşağı-mürəkkəbliyə malik olan ardıcıllıqların tənzimlənən fosforlaşması Şəkil 10-37b-də müzakirə olunan mRNP-lər kimi RNP zərrəciklərin tənzimlənən şəkildə yaranmasını izah edə bilər.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 10-38 Spesifik neyron mRNT-ləri sinapsislərdə yerləşirlər. Dəniz ilbizi *Aplysia californica* sensor neyronları hədəf motor neyronlarla kultura olundular, belə ki, sensor neyronlardan olan proseslər motor neyronlardan olan proseslərlə sinapslar əmələ gətirdilər. Sol tərəfdəki mikrofoto göy fluoressyent boya ilə vizuallaşdırılmış motor neyronun proseslərini göstərir. GFP-VAMP (yaşıl) sensor neyronlarında ekspressiya olunmuşlar və sensor neyronları ilə motor neyronların prosesləri (oxlar) arasında yaranan sinapsislərin yerlərini nişanlayırlar. Sağ tərəfdəki mikrofoto antisensorin mRNT probları ilə in situ hibridləşmənin qırmızı fluoressyesiyanı göstərir. Sensorin yalnız sensor neyronları ilə ekspressiya olunan neyrotransmiterdir (neyroötürücü); sensor neyronları prosesləri bu preparatda vizuallaşdırılmayıb, amma onlar motor neyron proseslərinə bitişikdirlər. In situ hibridləşmə nəticələri göstərir ki, sensorin mRNT-lər sinapslarda yerləşirlər. [Elsevier razılığı ilə Lyles, V., et al., "Synapse formation and mRNA localization in cultured *Aplysia* neurons," *Neuron,* 2006, **49**(3):349–356-dan yenidən çap olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc vasitəsilə alınmışdır.]

Məməlilərin Sinir Sistemndə mRNT-lərin Sinapslarda Yerləşməsi Əvəllər qeyd olunduğu kimi, sinapslarda spesifik mRNT-lərin neyronların nüvəsindən uzaqda lokalizasiyası, öyrənmə və yaddaş kimi proseslərdə əhəmiyyətli rol oynayır (Şəkil 10-38). Mayada lokalizasiya olunan mRNT-lər kimi, bu mRNT-lər də 3′ UTR-da RNT lokalizasiya siqnalına malikdirlər. Bu mRNT-lərdən bəziləri ilkin olaraq, translyasiyanın inisiasiyasına imkan verməyən qısa poli(A) quyruqla sintez olunurlar. Bir daha, lokalizasiya siqnalı daşıyan çoxsaylı

mRNT-lərə malik olan böyük RNP zərrəciklər sitoplazmada nüvə yaxınlığında formalaşırlar. Belə olan halda, RNP zərrəciklər, aksonun uzunluğu boyu uzanan mikroborucuqlarla hərəkət edən kinezin motor zülallarla aksonla aşağıya doğru, sinapslara daşınırlar (bax Fəsil 18). Sonra, verilmiş sinapsda elektrik fəallığı, sinaps rayonunda mRNT-lərin poliadenilləşməsini stimullaşdıra bilir, bu sinapsın ölçüsünü artıra və neyrofizioloji xüsusiyyətini dəyişə bilən kodlaşdırılan zülalın translyasiyasını fəallaşdırır, amma bu neyron tərəfindən yaradılmış yüzlərlə və ya minlərlə digər sinaslara təsir etmir.

10.4 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSIYALARI

Post-transkripsiya Nəzarətinin Sitoplazmatik Mexanizmləri

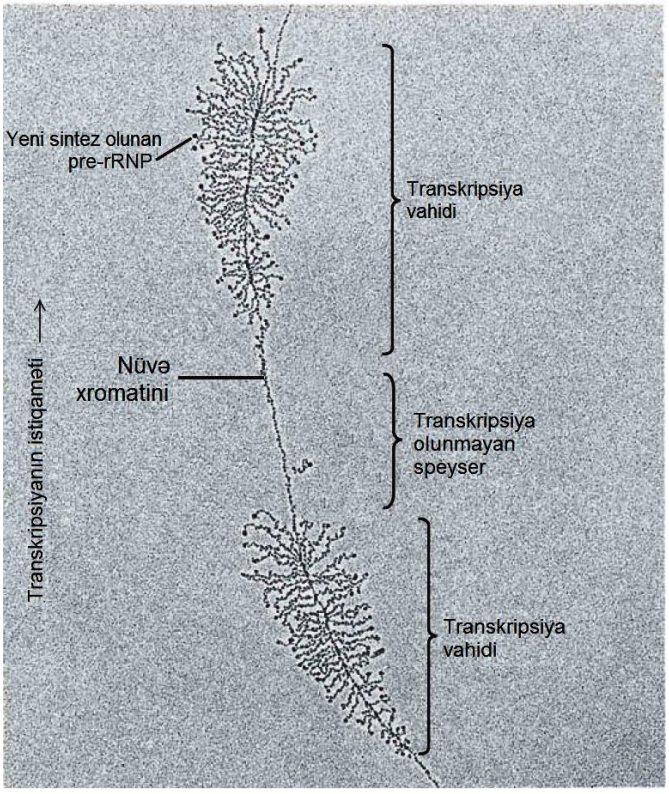
- mRNT-ləin əksəriyyəti, poli(A) quyruğun tədricən qısaldılması (deadenilləşməsi) və ardınca da eqzosomlar-vasitəsi ilə 3′→5′ doğranması yolu ilə və ya 5′ papağın uzaqlaşdırılması və 5′→3′ eqzoribonukleazalarla doğranması yolu ilə parçalanır (bax Şəkil 10-27).
- Qısa sıçrayışlarla ekspressiya olunan zülalları kodlaşdıran eukariotik mRNT-lər əsasən onların 3′ UTR rayonunda AU-ilə zəngin ardıcıllığın (AU-zəngin element) təkrarlanan nüsxələrinə malik olurlar. Bu elementlərə birləşən spesifik zülallar da deadenilləşməni aparan fermentlərlə və sitoplazmatik eqzosomlarla qarşılıqlı əlaqədə olaraq sürətli RNT parçalanmasını təşviq edirlər.
- Translyasiya, spesifik mRNT-lərin 3′ translyasiya olunmayan (3′ UTR) rayonundakı ardıcıllıqla qeyri mükəmməl hibrid əmələ gətirən mikro-RNT-lərlə (miRNT) repressiya oluna bilir. Bir sıra miRNT-lərlə birləşmiş mRNT-lər sitoplazmada P cismlərdə toplanırlar, onlar burada papağı itirməklə və ardınca da sitoplazmatik eqzosomlarda doğranmaqla parçalanırlar.
- Böyük ehtimalla, viruslara və transpozonlara qarşı ilkin müdafiə sistemi kimi yaranıb inkişaf etmiş RNT müdaxiləsi ilə bağlı olan fenomen, qısa müdaxilə RNT-ləri ilə (siRNT-lər) mükəmməl hibrid əmələ gətirən mRNT-lərin parçalanmasına səbəb olur.
- Həm miRNT-lər həm də siRNT-lər 21-23 nukleotidə malik olub daha uzun sələf molekullardan törəyirlər və Arqonaut zülalla birləşərək çoxzülallı RNT-ilə induksiya olunan susdurucu kompleksdə (RISC) toplanırlar. RISC kompleksi ya hədəf mRNT-nin translyasiyasını repressiya edib onun P cismlərdə lokalizasiyasını induksiya edir və burada onlar parçalanırlar (miRNT-lər), ya da onları kəsərək (siRNT-lər) müdafiə olunmamış ucları əmələ gətirirlər ki, bunlar da sitoplazmatik eqzosomlarla və 5′→3′ eqzonukleaza XRN1 ilə sürətlə parçalanırlar. (bax Şəkillər 10-28 və 10-29).
- Sitoplazmatik poliadenilləşmə qısa poli(A) quyruqlu mRNT-lərin translyasiyası üçün tələb olunur. Onların 3′-UTR-nda tənzimləyici elementlərə xüsusi zülalın birləşməsi bu mRNT-lərin translyasiyasını repressiya edir. Bu RNT-birləşdirən zülalın xarici siqnalla induksiya olunan fosforlaşması 3′ poli(A) quyruğun uzunamasına və beləliklə də translyasiyanın baş verməzinə səbəb olur (bax Şəkil 10-31).
- Müxtəlif zülalların mRNT-lərin 3′ və ya 5′ UTR-larında tənzimləyici elementlərə birləşməsi sitoplazmada çox mRNT-lərin translyasiyasını və ya parçalanmasını tənzimləyir.
- Ferritin mRNT-nin translyasiyası və transferin reseptor (TfR) mRNT-nin parçalanması, hər ikisi dəmirə-həssas RNT-birləşdirən eyni zülalla, IRE-BP ilə tənzimlənir. Dəmirin aşağı qatılıqlarında, bu zülal fəal konformasiyada olur və mRNT-lərdə sütun-ilgək əmələ gətirən spesifik ardıcıllıqlara birləşir, ferritin mRNT-nin translyasiyasını və TfR mRNT-nin parçalanmasını ingibirləşdirir, (bax Şəkil 10-33). Belə ikiqat nəzarət hüceyrələr daxilində dəmirin səviyyəsini dəqiqliklə nizamlayır.
- Nonsense-vasitəsilə dağılma və digər mRNT nəzarət mexanizmləri, müvafiq normal zülalların funksiyasına mane ola bilən anormal zülalları kodlaşdıran, düzgün prosess olunmamış mRNT-lərin translyasiyasına mane olur.
- Çox mRNT-lər, adətən 3′ UTR-da aşkar olunan lokalizasiya ardıcıllıqlarına birləşən ardıcıllıq-spesifik RNT-birləşdirən zülallar vasitəsilə xüsusi sub-hüceyrə nahiyələrinə (hissələrinə) daşınırlar. Bu RNT birləşdirən zülallar, sonra birbaşa və ya vasitəçi zülalların köməyi ilə dolayı yolla, sitoplazmada xüsusi hüceyrə sahələrində yerləşmək üçün aktində və ya mikroborucuq liflərində lokalizasiya siqnallarını daşıyan mRNT-lərə malik olan çoxsaylı RNP zərrəcikləri daşıyan motor zülallarla assosasiya edirlər.

10.5 rRNT və tRNT-lərin Prosessinqi

Sürətlə inkişaf edən məməlilərin hüceyrələrində (məsələn kultura olunan HeLa hüceyrələrində) ümumi RNT-nin təxminən 80 faizini rRNT və 15 faizini tRNT təşkil edir; beləliklə, zülal-kodlaşdıran mRNT ümumi RNT fraksiyasının yalnız kiçik bir hissəsini təşkil dirlər. Əksər rRNT genlərindən və tRNT genlərindən istehsal olunan əsas transkriptlər, bu RNT-lərin funksional formalarına çevrilmək üçün, pre-mRNT-lər kimi geniş şəkildə prosess olunurlar.

Ribosom yüksək dərəcədə inkişaf etmiş, zülal sintezində fəaliyyət göstərmək üçün optimallaşmış mürəkkəb quruluşa malikdir (bax Şəkil 5-22). Ribosomun sintezi hər üç nüvə RNT polimerazalarının fəaliyyətini və koordinasiyasını tələb edir. Böyük ribosomal subvahiddə birləşən 28S və 5.8S rRNT-lər və kiçik sibvahiddə olan tək bir 18S rRNT RNT polimeraza I ilə transkripsiya olunurlar. Böyük subvahidin 5S rRNTsi RNT polimeraza III ilə transkripsiya olunur və ribosomal zülalları kodlaşdıran mRNT-lər RNT polimeraza II ilə transkripsiya olunurlar. Dörd ribosomal RNT-dən və təxminən 70-ə qədər ribosomal zülallardan başqa ən azı 150 başqa RNT-lər və zülallar ribosomun toplanması zamanı əlaqələndirilmiş pillələr sırasında keçici olaraq iki ribosomal subvahidlə qarşılıqlı əlaqədə olurlar. Bundan əlavə, yetkin rRNT-nin çoxsaylı spesifik əsasları və ribozaları onların zülal sintezində fəaliyyətini optimallaşdırır. Baxmayaraq ki, ribosomal subvahidlərin sintezində və toplanmasında mərhələlərin çoxu **nüvəcikdə** (membranla ayrılmayan nüvə subkompartmentində) baş verir, bəzi mərhələlər nüvəcikdən nüvə məsamələri kompleksinə gedərkən nukleoplazmada həyata keçirilir.

Keyfiyyət nəzarəti mərhələsi nüvə eksportundan öncə baş verir, belə ki, tam funksional subvahidlər sitoplazmaya eksport olunurlar, burada ribosom subvahidlərinin yetişməsinin sonuncu mərhələsi baş verir. tRNT-lər də sitoplazmaya eksport olunmazdan və orada zülal sintezində istifadə olunmaqdan öncə nüvədə əsas sələf transkriptlərdən prosess olunaraq geniş şəkildə modifikasiya olunurlar. Biz bu bölməni rRNT-lərin prosessinqini və modifikasiyalarını və onların nüvədə ribosomda toplanmasının və nüvədən eksportunun müzakirəsi ilə başlayırıq. Sonra, biz tRNT-lərin prosessinqi və modifikasiyalarına baxırıq.

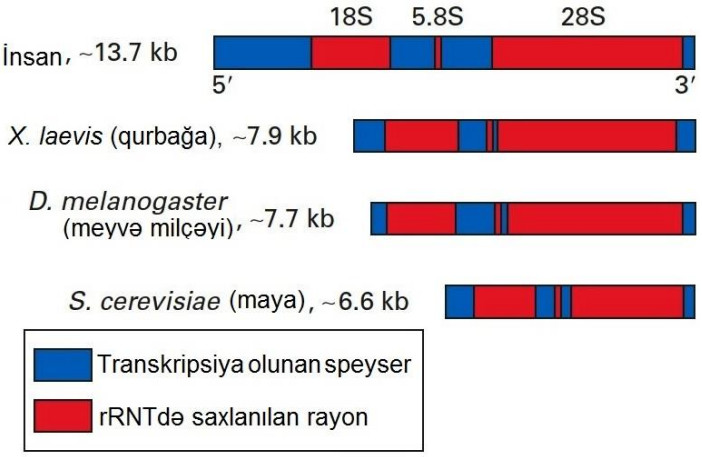


EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 10-39 Qurbağanın oositinin nüvəsində pre-rRNT transkripsiya vahidinin elektron mikrofotosu. Hər bir "lələk", transkripsiya vahidindən yaranan pre-ribonukleozülal kompleksindəki (pre-rRNP) zülallarla assosasiyada olan çoxsaylı pre-rRNT molekullarını təmsil edir. Qeyd edək ki, hər bir yeni sintez olunan pre-RNP-nin 5′ sonluğundakı sıx "qabarıq" guman olunur ki, prosessomdur. Pre-rRNT transkripsiya vahidi tandem düzülmüşdür və bir-birindən nüvə xromatinin transkripsiya olunmayan boşluq (spacer) rayonları ilə ayrılmışdır. [Hörmətlə Y. Osheim and O.J. Miller, Jr.]

Pre-rRNT Genləri Nüvəcik Quruculları Kimi Fəaliyyət Göstərirlər

Böyük ribosomal subvahiddə (60S) birləşən 28S və 5.8S rRNT-lər və kiçik ribosomal subvahiddə (40S) birləşən 18S rRNT ali eukariotlarda (və bütün başqa eukariotlarda fəaliyyətinə görə ekvivalent olan rRNT-lər) tək bir tip pre-rRNT transkripsiya vahidi tərəfindən kodlaşdırılır. İnsan hüceyrələrində, onun RNT polimeraza I ilə transkripsiya olunan 45S (~13.7 kə) əsas transkripti (pre-rRNT) sintez edir, bu transkript kəsilərək 28S, 18S və 5.8S rRNT-lərə prosess olunur. Dördüncü rRNT, 5S rRNT ayrıca kodlaşdırılır və nüvəcikdən kənarda transkripsiya olunur. Çoxsaylı müxtəlif növlərdən 45S pre-rRNT-ni kodlaşdıran DNT ardıcıllığının oxunması göstərdi ki, bu DNT bir sıra xüsusiyyətləri ilə bütün eukariotlarda oxşardır. Birincisi, pre-rRNT genlər, bir-birindən, qurbağada 2 kə-dan insanda 30 kə-qədər dəyişilən transkripsiya olunmayan speyser (boşluq) rayonu ilə ayrılmış uzun tandem sıralarda düzülmüşlər (Şəkil 10-39). İkincisi, üç yetkin rRNT-yə uyğun olan genom rayonları həmişə eyni istiqamətdə, 5′→3′ istiqamətdə: 18S, 5.8S və 28S ardıcıllığı ilə düzülmüşlər. Üçüncüsü, bütün eukariotik hüceyrələrdə, (hətta bakterialarda), pre-rRNT gen prosessinqi zamanı atılan və sürətlə parçalanan rayonları kodlaşdırır. Bu rayonlar, çox güman ki, rRNT-lərin düzgün bükülməsinə kömək edirlər, amma bükülmə başa çatdıqdan sonra bunlara tələbat qalmır. Pre-rRNT-lərin əsas quruluşu Şəkil 10-40-da verilmişdir.

Pre-rRNT-nin sintezi və prosessinqlərinin əksəriyyəti *nüvəcikdə* baş verir. Pre-rRNT genləri ilk dəfə nüvəcikdə in situ hibridləşmə yolu ilə identifikasiya olunanda, nüvəciyi yaratmaq üçün başqa bir DNT-nin tələb olunub olunmadığı məlum deyildir. Transgen *Drosophila* ştammları ilə aparılan ardıcıl eksperimentlər göstərdi ki, bir tam pre-rRNT transkripsiya vahidi kiçik bir nüvəciyin yaranmasını induksiya edir. Beləliklə tək bir pre-rRNT geni kifayətdir ki, *nüvəciyin təşkilatçısı* olsun və ribosomun bütün başqa komponentləri yeni yaranmış pre-rRNT-yə diffuziya etsin. Nüvəciyin işıq və elektron mikroskopu ilə müşahidə olunan quruluşu pre-rRNT-nin prosessinqindən və ribosomal subvahidlərin toplanmasından alınmışdır.



ŞƏKİL 10-40 Eukariotik pre-rRNT transkripsiya vahidinin ümumi quruluşu. Üç kodlaşdırıcı rayon (qırmızı) ali eukariotların ribosomlarında və ya başa növlərdə tapılmış ekvivalentlərində olan 18S, 5,8S və 28S rRNT-ləri kodlaşdırır. Genomda bu kodlaşdırıcı rayonların ardıcıllığı həmişə 5′→3′ istiqamətində olur. Transkripsiya olunan speyser rayonların (mavi) uzunluğundakı variasiya müxtəlif orqanizmlərdə pre-rRNT transkripsia vahidinin uzunluğundakı əsas fərqləri təşkil edir.

Kiçik Nüvə RNT-ləri Pre-rRNT-lərin Prosessinqinə Kömək Edir

Ribosomal subvahidlərin toplanması, yetişməsi və sitoplazmaya eksport olunması *S. cerevisiae* maya hüceyrələrində yaxşı anlaşılmışdır. Amma, bura daxil olan zülalların və RNT-lərin demək olar ki, hamısı çoxhüceyrəli eukariotlar üçün konservativdir və yəqin ki, ribosom biosintezinin fundamental aspektləri eynidir. Pre-mRNT-lərdə olduğu kimi, yeni sintez olunan pre-rRNT transkriptləri də dərhal zülallarla birləşir və preribosomal ribonukleozülal (pre-rRNP) zərrəcikləri yaradırlar. Hələ məlum olmayan səbəbdən, pre-rRNT kəsilməsi pre-rRNT-nin transkripsiyası tam başa çatana qədər başlamır. Mayada, pre-rRNTnn transkripsiyası təxminən 6 dəqiqə çəkir. Transkripsiya tamamlandıqdan sonra, rRNT kəsilir və təxminən 10 saniyəyə əsaslar və ribozalar modifikasiya olunurlar. Tez inkişaf edən maya hüceyrələrində, hər saniyədə təxminən 40 cüt ribosomal subvahid sintez olunaraq, prosess olunur və sitoplazmaya daşınır. Baxmayaraq ki, pre-rRNT-nin transkripsiyası üçün uzun zaman tələb olunur, ribosomun belə həddən artıq yüksək dərəcədə sintezi mümkündür, çünki pre-rRNT genləri eyni zamanda eyni geni transkripsiya edən çoxsaylı RNT polimeraza I molekulları ilə örtülmüşdür (bax Şəkil 10-39), həmçinin ona görə ki, maya hüceyrəsi nüvəsinin təşkilində XII xromosomda bu cürə 100-200 gen vardır.

Təxminən ~6.6 kə ilkin transkript eqzonukleotik mərhəllələrdə bir sıra kəsilmə nahiyələrindən doğranır və nəticədə ribosomlarda tapılmış yetkin rRNT-ləri əmələ gətirir (Şəkil 10-41). Prosessinq zamanı, pre-rRNT, əsasən spesifik ribozaların 2′-hidroksil qruplarının metilləşməsi ilə və spesifik uridin qalıqlarının psevdouridinə çevrilməsi ilə geniş şəkildə modifikasiya olunur. rRNT-nin belə post-transkripsiya modifikasiyaları yəqin ki, zülal sintezi üçün əhəmiyyətlidir, çünki onlar yüksək dərəcədə konservativdirlər. Faktiki olaraq, bütün bu dəyişikliklər ribosomda ən çox konservativ olan və zülal sintezində birbaşa iştirak edən əsas quruluşda baş verir.

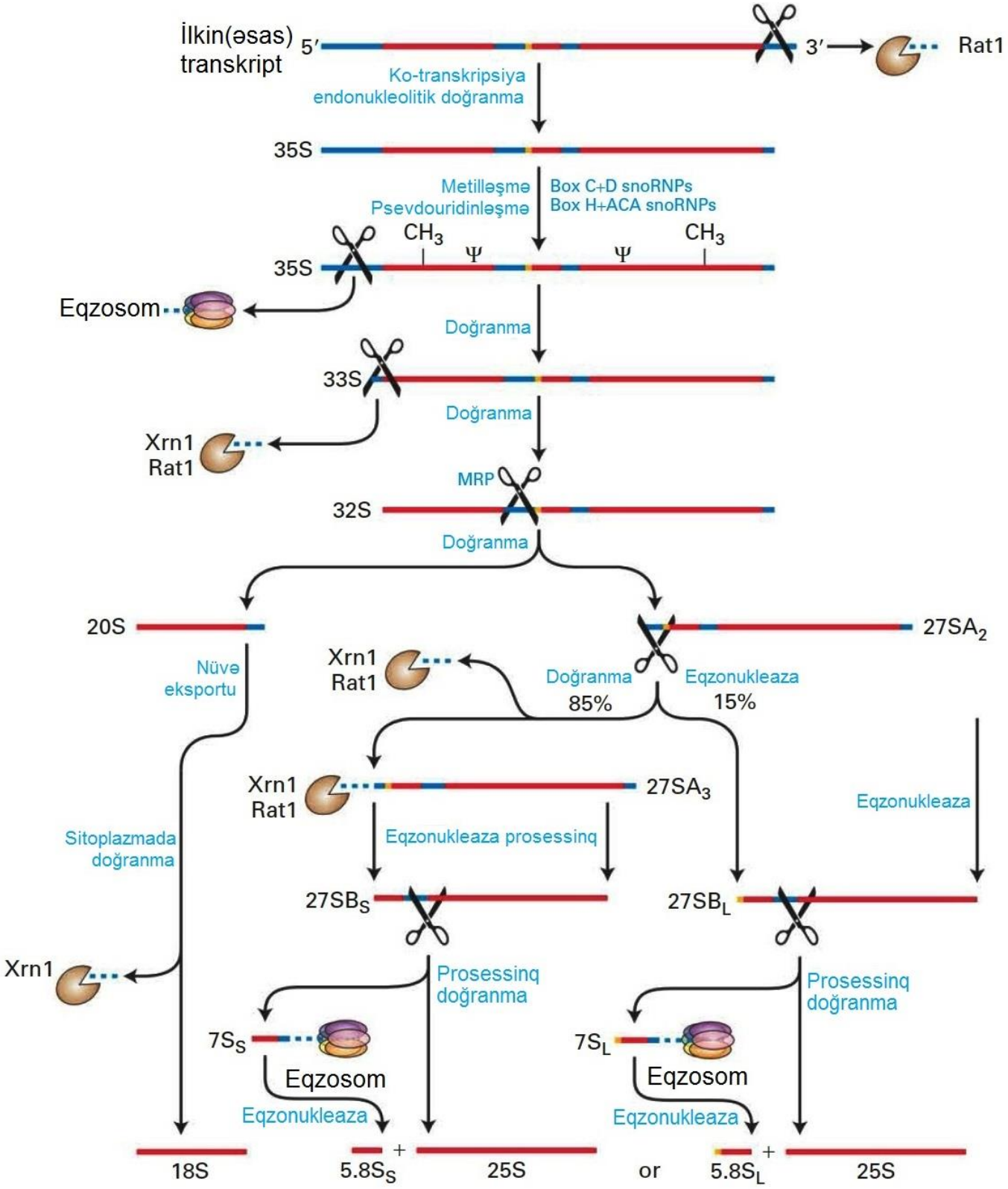
U3 snoRNT, təxminən 72 zülaldan ibarət olan, kiçik subvahid (SSU) prosessomu adlanan, pre-rRNT-nin 5′ sonluğunda olan ilkin kəsilmə yaxınlığındakı A_0 saytında kəsilməni məyyənləşdirən böyük snoRNP daxilində toplanır, (bax Şəkil 10-41). U3 snoRNT, kəsilmənin yerini müəyyən etmək üçün pre-rRNT-nin yuxarıya istiqamətdəki rayonu ilə əsas cütü əmələ gətirir. Guman olunur ki, prosessom pre-rRNT-nin elektron mikrofotosunda görünə bilən "5′ qabarıq" əmələ gətirir (bax Şəkil 10-39). Başqa snoRNP-lərin əsas cütü əmələ gətirməsi, transkripsiya olunan speyser rayonlarını uzaqlaşdıran əlavə kəsilmə reaksiyalarını müəyyən edir. Mayanın böyük subvahidinin 5.8S və 25S rRNT-lərinin prosessinqini başlamaq üçün birinci kəsilmə, doqquz zülalın RNT ilə birlikdə əmələ gətirdiyi kompleks MRP RN-aza ilə yerinə yetirilir. Speyser ardıcıllıqları pre-rRNT-lərdən kəsildikdən sonra, pre-mRNT-dən splays olunub ayrılmış intronları parçalayan eyni eqzosomla-assosasiyada olan 5′→3′ nüvə eqzonukleazaları ilə parçalanır. Nüvə 5′→3′ eqzoribonukleazaları (mayada Rat1; insanlarda XRN1) 5′ speyserin bəzi rayonlarını da kəsib uzaqlaşdırır.

Bəzi snoRNT-lər öz promotorlarından RNT polimeraza II və ya III vasitəsilə ilə ekspressiya olunurlar. Amma, qəribədir ki, snoRNT-lərin böyük əksəriyyəti ribosomların sintezində və translyasiyada iştirak edən zülalların funksional mRNT-lərini kodlaşdıran genlərdən splays olunub çıxarılmış intronlarından prosess olunurlar. Bəzi snoRNT-lər isə görünür ki, qeyri funksional mRNT-lərdən splays olunub çıxarılmış intronlardan prosess olunurlar. Görünür, bu mRNT-ləri kodlaşdıran genlər yalnız kəsilib çıxarılmiş intronlardan snoRNT-ləri ekspressiya etmək üçün mövcud olurlar.

18S, 5.8S və 28S genlərdən fərqli olaraq, 5S rRNT genləri nukleoplazmada RNT polimeraza III ilə transkripsiya olunurlar. Yalnız 3′ sonluqda nukleotidləri ayırıb uzaqlaşdıran çox kiçik əlavə prosessinqlə 5S rRNT nüvəciyə diffuziya edir və orada pre-rRNT sələflə birlikdə toplanaraq, onun kəsilərək böyük ribosomal subvahidin sələfini əmələ gətirən rayonu ilə assosasiya etmiş vəziyyətdə qalır.

Kiçik (40S) ribosomal subvahidin ribosomal zülallarının əksəriyyəti transkripsiya gedişində yeni sintez olunan pre-rRNT ilə birləşir (Şəkil 10-43). 90S RNP sələfdə tam uzunluqlu pre-rRNT-nin kəsilməsi, sitoplazmaya daşınmazdan öncə yalnız bir neçə remodelinq mərhələsi tələb olunan pre-40S zərrəciyi əmələ gətirir. Pre-40S zərrəcik nüvəciyi tərk etdikdən sonra, tez bir şəkildə nukleoplazmanı keçir və aşağıda müzakirə olunduğu kimi, nüvə məsamələri kompleksindən (NPC) keçərək sitoplazmaya eksport olunur. Kiçik ribosom subvahidinin son yetişmə mərhələsi: 20S rRNT-nin sitoplazmatik 5′→3′ eqzoribonukleaza XRN1 vasitəsilə kiçik yetişmiş 18S rRNT-yə eqzonukleolitik prosessinqi və 18S rRNT-nin 3′ sonluğu yaxınlığında iki yaxın adeninin sitoplazmatik ferment Dim 1 ilə dimetilləşməsi sitoplazmada baş verir.

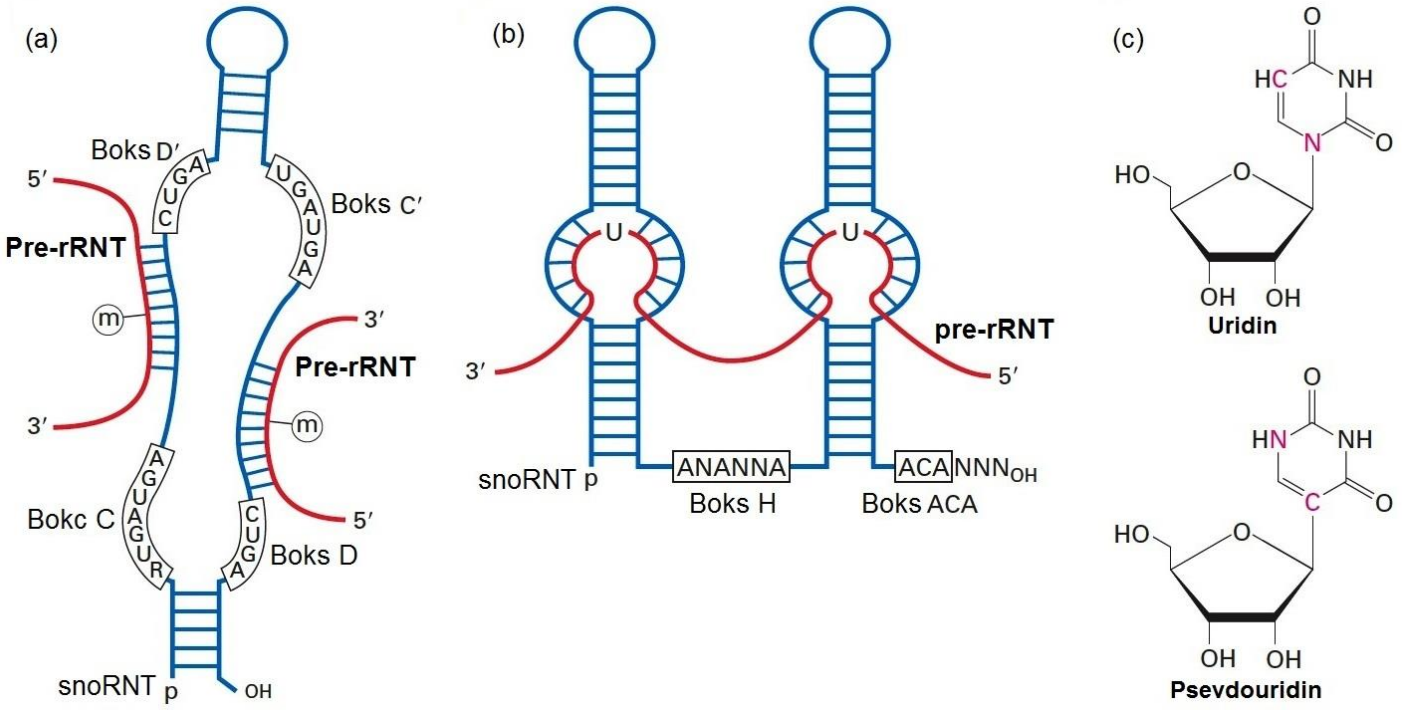
Spesifik 2′-O-metilləşmə və psevdouridin əmələgəlmə saytlarının yerləşmə mövqeyi nüvəcikdə- məhdudlaşan, kiçik nüvəcik RNT-ləri (snoRNT) adlanan və pre-rRNT molekulları ilə hibridləşən təxminən 150 fərqli RNT nümunələri ilə müəyyən edilir. Pre-mRNT prosessinqində iştirak edən snRNT-lər kimi, snoRNT-lər də zülallarla birləşirlər və snoRNP-lər adlanan ribonukleozülal zərrəciklərini yaradırlar. 40-dan artıq snoRNP-lərin (C+D snoRNT-lər boksuna malik olan) bir sinifi metiltransferaza fermentini pre-rRNT-də metilləşmə saytı yaxınlığında yerləşdirir. Çoxsaylı fərqli C+D snoRNT-lər boksu metilləşməni oxşar mexanizmlə çoxsaylı saytlara yönəldirlər. Onlar ümumi ardıcıllıq və quruluş xüsusiyyətlərinə görə oxşardırlar və oxşar zülallar dəsti ilə birləşmişlər. Bu snoRNT-lərin bir və ya iki rayonu, pre-rRNT-də olan saytlarla dəqiq komplementarlığa malikdir və metiltransferazanı onların hibridləşdikləri rayondakı xüsusi ribozalara yönəldirlər (Şəkil 10-42a). snoRNT-lərin ikinci əsas sinifinin nümayəndələri (H+ACA snoRNT boksuna malik olanlar) uridini psevdouridinə çevirən fermentin mövqeyini müəyyən edirlər (Şəkil 10-42b). Bu çevrilməyə pirimidin halqasının fırlanması daxildir (Şəkil 10-42c). Pre-rRNT-də modifikasiya olunmalı uridinin hər iki tərəfindəki əsaslar H+ACA snoRNT-də sütundakı qabarıqların əsasları ilə cütləşirlər, pre-mRNT splaysesomal splaysinqində şaxələnmə nöqtəsi A-da olduğu kimi (bax Şəkil 10-10), ikiqat-zəncirli spiral rayonunda uridini qabarıb çıxmış vəziyyətdə saxlayırlar. Pre-rRNT nukleotidlərinin adenin dimetilləşməsi kimi digər modifikasiyaları, bələdçi snoRNP-lərin köməyi olmadan xüsusi zülallarla aparılır.



ŞƏKİL 10-41 Mayada pre-rRNT prosessinqi. Daxili kəsilmələri həyata keçirən endoribonukleazalar qayçı kimi təsvir olunmuşdur. 5′ və ya 3′ ucların istənilən birindən kəsən eqzonukleazalar Pak-Men kimi göstərilmişdir. rRNT-lərdə 2′-*O*-riboza metilləşmənin (CH_3) və psevdouridinlərin yaranmasının (Ψ) əksəriyyəti 3′ sonluqda ilkin kəsilmənin ardınca və 5′ sonluqdakı ilkin kəsilmədən öncə baş verir. Bu mərhələdə iştirak edən məlum olan zülallar və snoRNP-lər göstərilmişdir. Bax J. Venema and D. Tollervey, 1999, *Ann.Rev.Genetics* **33**:261.]

Pre-40S zərrəciyin əksinə olaraq, böyük subvahidin sələfi, tam yetişib sitoplazmaya keçməzdən öncə qeyri ribosomal zülallarla daha çox müvəqqəti birləşməklə əhəmiyyəyli dərəcədə remodelinqi tələb edir. Nəticədə, 60S subvahidin nüvəni tərk etmək üçün yetişməsi kifayət qədər uzun zamana başa gəlir (kultura olunmuş insan hüceyrələrində 40S subvahidin başa gəldiyi 5 dəqiqə ilə müqayisədə 30 dəqiqə). Çoxsaylı ehtimal olunan RNT helikazalar və kiçik G zülallar yetişən 60S subvahidlə birləşirlər. Bəzi RNT helikazalar, pre-rRNT ilə 30 əsas cütü ölçüsünə qədər mükəmməl əsas cütü əmələ gətirən snoRNP-ləri sıxışdırıb çıxarmaq üçün tələb olunurlar. Digər RNT helikazalar, zülal-RNT qarşılıqlı əlaqələrinin qırılmasında fəaliyyət göstərə bilirlər. Çoxsaylı GTP-azalara olan tələbat göstərir ki, böyük RNP subvahidinin toplanmasında və remodelinqində çoxsaylı keyfiyyət-nəzarəti yoxlama nöqtələri vardır, bu zaman hər bir pillə, növbəti pillənin başlanmasına imkan yaradan GTP-aza fəallaşmamışdan öncə başa çatmalıdır. **AAA ATP-aza** ailəsinin nümayəndələri də keçici olaraq birləşirlər. Bu sinifə aid olan zülallar çox zaman böyük molekulyar hərəkətlərdə iştirak edirlər və ola bilsin ki, böyük rRNT kompleksinin düzgün konformasiyada bükülməsi üçün tələb olunurlar. 60S subvahidin yetişməsinin bəzi pilləleri nukleoplazmada, nüvəcikdən nüvə məsamələri kompleksinə keçən zaman baş verir (bax Şəkil 10-43). Ribosomal subvahidlərin formalaşması zamanı ortaya çıxan maraqlı və əhəmiyyətli remodelinq prosesslərinin kompleksi barədə hələ çox şey öyrənilməyib.

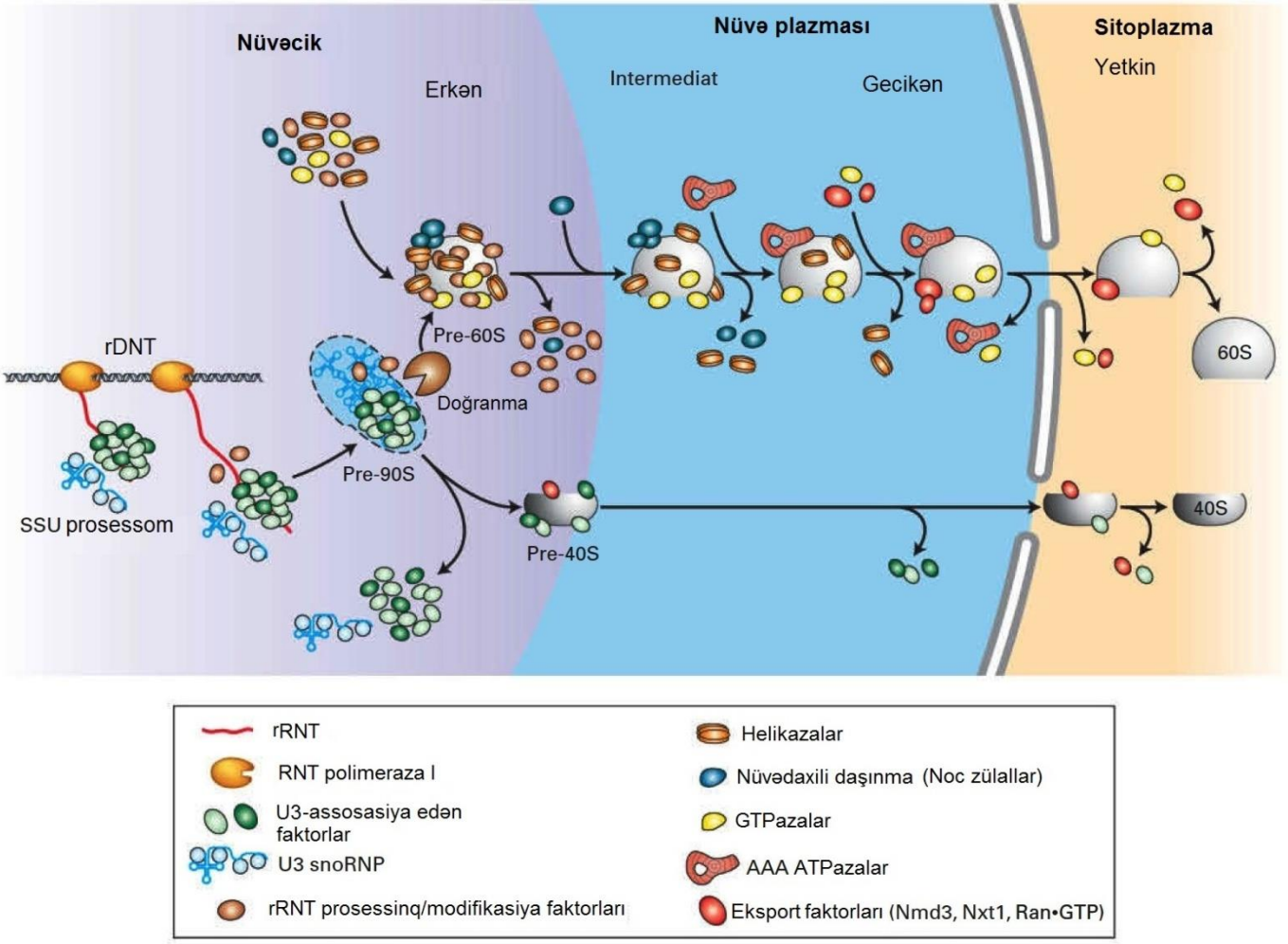
Böyük ribosomal subvahid nüvə məsamələri kompleksindən keçən ən böyük quruluş vahididir. Nukleoplazmada böyük subvahidin yetişməsi, Nmd3 adlanan nüvə eksportu adaptorlarının birləşmə saytlarının yaranmasına səbəb olur. Nmd3 nüvə transporteri olan Eksportin 1 (həmçinin Crm1 adlanır) tərəfindən birləşir. Bu burləşmə başqa bir keyfiyyət-nəzarəti pilləsidir, çünki yalnız düzgün toplanmış subvahid Nmd3 ilə birləşir və eksport olunur. mRNP eksporterin kiçik subvahidi (Nxt1) də həmçinin təxminən yetişməyə yaxın olan böyük ribosomal subvahidlə birlişir. Bu nüvə transporterləri



ŞƏKİL 10-42 Pre-rRNT-lərin snoRNP ilə istiqamətlənən modifikasiyası. (a) snoRNT-lərin C+D snoRNT-lər boksu adlanan sinifi 2′-*O*-riboza metilləşməsində iştirak edir. Burada göstərilən snoRNT-nin ardıcıllığı pre-rRNT-nin iki müxtəlif rayonu ilə hibridləşir və göstərilmiş saytlarda metilləşməni yönəldir. (b) H+ACA snoRNT boksu, sütunlarında daxili bir-zəncirli qabarıqlara malik olan iki sütun-ilgəyə qatlanır. Pre-rRNT bir-zəncirli qabarıqlara hibridləşir, psevdouridilləşmə saytına sərhəd çəkir. (c) Uridindən psevdouridinə çevrilmədə pirimidin halqasının fırlanması baş verir. Bax T. Kiss, 2001, *EMBO J*.**20**:3617.

böyük subvahidin NPC-nin, kanalının divarını örtən zülalların qurulumuş hissələrindən uzanaraq çıxan qurulmamış zülal domenlərinin buludu ilə doludurulmuş mərkəzi kanalından (bax Fəsil 13) diffuziya edib keçməsinə imkan verir. NPC mərkəzi kanalın divarını əmələ gətirən bir sıra əlavə zülal subvahidləri də ribosomal subvahidlərin eksportu üçün tələb olunur və ola bilsin ki, bu məqsədlə başqa funksiyaları da yerinə yetirirlər. Ribosomal subvahidlərin ölçüləri (~25-30 nm diametrdə) və NPC-nin mərkəzi kanalının ölçüsü uyğundurlar, ona görə də keçid ribosomal subvahidlərin və ya kanalın zədələnməsinə səbəb olmur. Böyük subvahidin yetişməsinin son mərhələsi sitoplazmada bu eksport faktorların uzaqlaşdırılmasıdır. tRNT-

lər və pre-miRNT-lər daxil olmaqla (amma əksər mRNP-lər istisna olmaqla) makromolekulların əksəriyyətinin nüvədən eksportunda olduğu kimi, ribosom subvahidlərinin eksportu da, Fəsil 13-də müzakirə olunduğu kimi, Ran adlanan kiçik G zülalların iştirakını tələb edir



ŞƏKİL 10-43 Ribosomal subvahidlərin toplanması. Yetişmiş kiçik və böyük ribosomal subvahidlərdə ribosomal zülallar və RNT-lər mavi rənglə, sitoplazmadakı yetişmiş subvahidlərin nişanələrinə bənzər formada təsvir edilmişdir. Yetişən subvahidlərlə müvəqqəti birləşən başqa faktorlar, əsas hissədə göstərildiyi kimi, başqa rənglərlə təsvir edilmişdir. Bax H. Tschochner and E. Hurt , 2003, *Trends Cell Biol.* **13**:255.

I Qrup İntronların Özünü-Splaysinqi Katalitik RNT-lərin İlk Nümunələri Olmuşdur

1970-ci illərdə, protozoan *Tetrahymena thermophila*-nın pre-rRNT genlərinin introna malik olmaları aşkar olunmuşdur. Ciddi şəkildə aparılmış tədqiqatlarda hətta əlavə ardıcıllığı olmayan tək bir pre-rRNT genin aşkar olunması cəhdləri uğursuz oldu, və göstərdi ki, bu orqanizmlərdə yetkin rRNT-nin istehsalı splaysinqi tələb edir. 1982-ci ildə, in vitro tədqiqatlar aşkar etdi ki, pre-rRNT, hər hansı bir zülalın iştirakı olmadan belə, düzgün saytlarda splays olunur, bu ilk dəfə olaraq RNT-nin, fermentlərdə olduğu kimi, katalizator kimi fəaliyyət göstərə bilməsini nümayiş etdirdi.

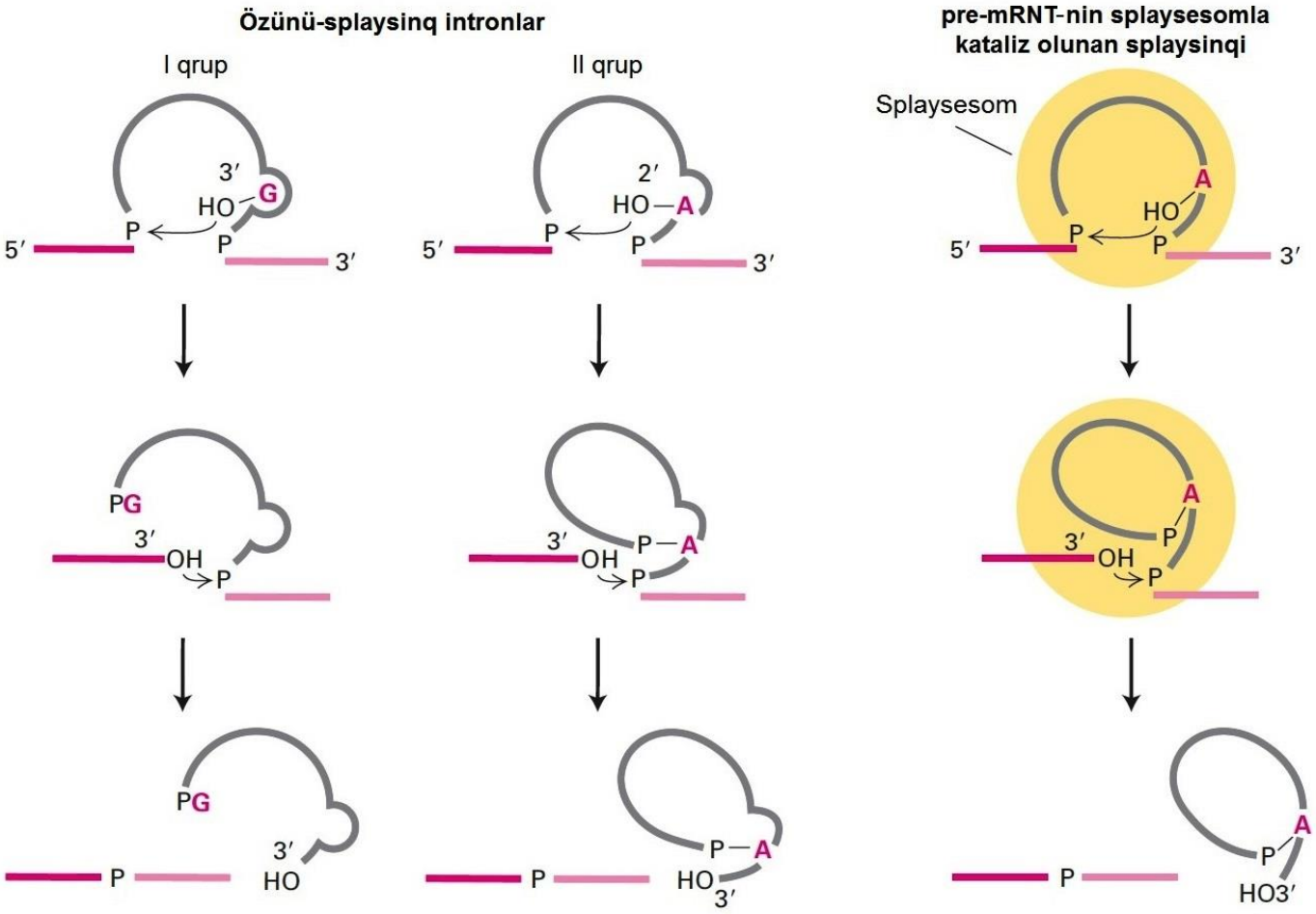
Özünü-splaysinq ardıcıllıqların böyük bir hissəsi sonralar uyğun olaraq başqa bir-hüceyrəli orqanizmlərdə, mitoxondri və xloroplast pre-rRNT-lərdə, müəyyən *E. coli* bakteriofaqlarının bir sıra pre-mRNT-lərində və bəzi bakterial ilkin tRNT transkriptlərində tapılmışdır. Bütün sələflərdə, *I qrup intronlar* kimi adlandırılan özünü-splaysinq ardıcıllıqları kofaktor kimi quanozindən istifadə edirlər və birləşdirilməli olan iki eqzonu yanaşı qoymaq üçün daxili əsas cütlərini yaratmaqla bükülə bilirlər. Əvəllər müzakirə olunduğu kimi, müəyyən mitoxondrial və xloroplast pre-mRNT-ləri və tRNT-lər, qrup II intronlar kimi adlandırılan ikinci tip özünü-splaysinq intronlara malikdirlər.

I qrup intronların, II qrup intronların və splaysesomların istifadə etdikləri splaysinq mexanizmləri əsasən oxşardırlar, bunlar başlanğıc enerji tələb etməyən iki transefirləşmə reaksiyalarını istifadə edirlər (Şəkil 10-44). Mutasiya və biokimyəvi eksperimentlərin kombinasiyasından istifadə edərək

Tetrahymena thermophila pre-rRNT-nin I qrup intronlarının, quruluş tədqiqatları aşkar etdi ki, zülallarda olduğu kimi, RNT də dəqiq üç-ölçülü quruluşda bükülür, substratın birləşməsi üçün dərin şırımlara və katalizdə fəaliyyət göstərən məhlulda-əlçatmayan rayonlara malik olur. I qrup intronlar, katalitik Mg^{2+} ionlarına yaxın (bitişik) olan iki transefirləşmə reaksiyalarında iştirak edən atomları dəqiqliklə yerləşdirmək üçün etallofermentlər kimi fəaliyyət göstərirlər. İndi kifayət qədər dəlillər sübut edir ki, splaysesomlarda II qrup intronlarla və snRNT-lərlə splaysinqdə birləşmiş katalitik Mg^{2+} ionları iştirak edirlər. I və II qrup özünü-splaysinq intronların hər ikisində və yəqin ki, splaysesomlarda RNT **ribozim** kimi, katalitik qabiliyyətə malik olan RNT ardıcıllığı kimi fəaliyyət göstərir.

Pre-tRNT-lər Nüvədə Geniş Modifikasiyaya Uğrayırlar

Ümimilikdə orta hesabla 75-80 nukleotid ardıcıllığından ibarət olan yetkin sitozol tRNT-lər, nüvə plazmasında RNT polimeraza III vasitəsi ilə sintez olunan böyük sələflərdən (pre-tRNT-lərdən) istehsal olunurlar. Yetkin tRNT-lər də, ilkin tRNT transkriptlərdə olmayan çoxsaylı modifikasiya olunmuş əsaslara malik olurlar. Kəsilmə və əsasların modifikasiyası bütün pre-tRNT-lərdə prosessinq zamanı baş verir, bəzi pre-tRNT-lər prosessinq zamanı həmçinin splays olunurlar. Bütün bu prosessinq və modifikasiya hadisələrinin gedişi nüvədə baş verir.



ŞƏKİL 10-44 I qrup və II qrup özünü-splaysinq intronlarda və pre-mRNT-lərin splaysesomla-kataliz olunan splaysinqdə splaysinq mexanizmləri. İntron boz rəngdə, ona birləşmiş eqzonlar isə qırmızı rəngdə göstərilmişdir. I qrup intronlarda, RNT zəncirinin bir hissəsi olmayan quanozin kofaktor (G) fəal mərkəzlə birləşir. Bu quanozinin 3′-hidroksil qrupu intronun 5′ ucundakı fosforla transefirləşmə reaksiyasında iştirak edir, bu reaksiya II qrup intronlarda şaxələnmə-saytı A-ların 2′-hidroksil qrupunun daxil olduğu və splaysesomlarda splays olunan pre-mRNT intronlarının reaksiyalarına (bax Şəkil 10-8) analojidir. Sonrakı, 5′ və 3′ eqzonları birləşdirən transefirləşmə hər üç splaysinq mexanizmlərində oxşardır. Qeyd etmək lazımdır ki, splays-olunmuş I qrup intronlar iki digər hallardakı şaxələnmiş intron məhsullarından fərqli olaraq xətti quruluşdadırlar. Bax P.A. Sharp, 1987, *Science* **235**:769.

Yetkin tRNT-lərdə olmayan dəyişkən uzunluqlu 5′ ardıcıllıq bütün pre-tRNT-lərdə mövcud olur (Şəkil 10-45). Bu əlavə 5′ nükleotidlərin mövcud olması ona görə baş verir ki, yetkin tRNT-lərin 5′ sonluğu, transkripsiyanın start saytı ilə deyil, tRNT-nin üç-ölçülü quruluşu ilə müəyyən olunan endonukleolitik kəsilmə yolu ilə yaradılır. Əlavə 5′ nukleotidlər

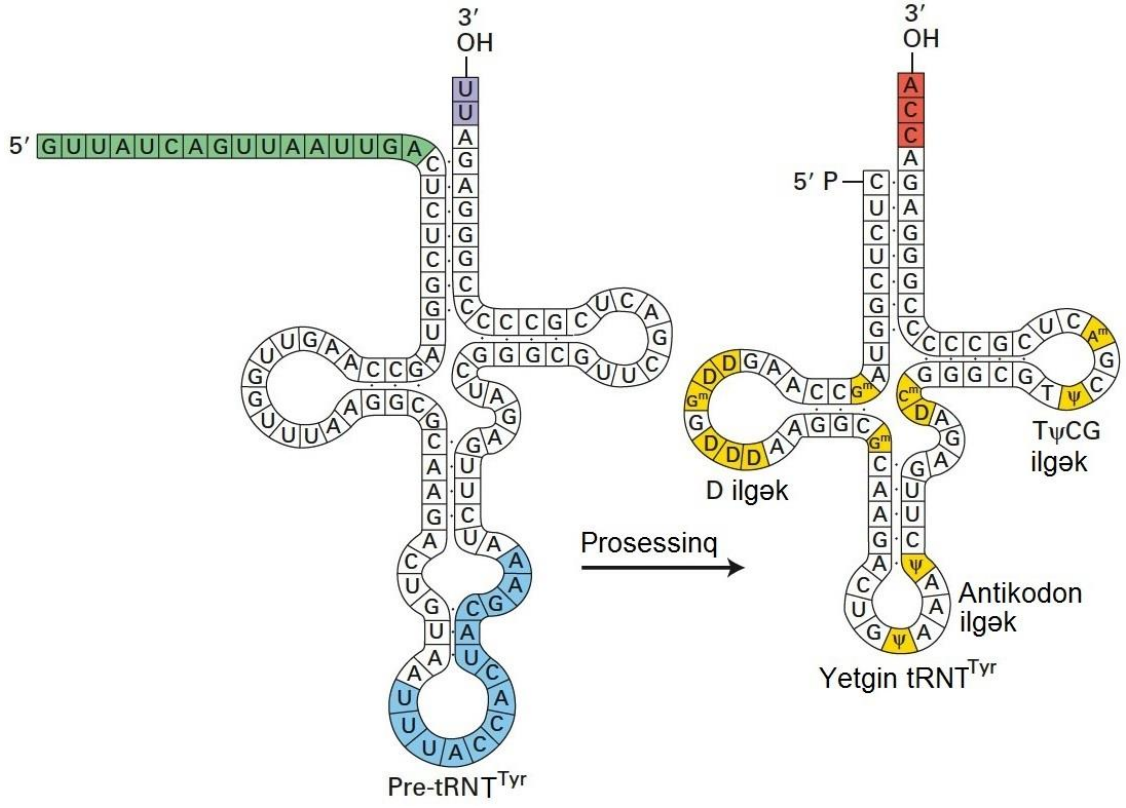
ribonukleozülal endonukleaza olan ribonukleaza P (RN-aza P) ilə uzaqlaşdırılır. *E. coli*-nin RN-aza P ilə aparılan tədqiqatlar göstərdi ki, Mg^{2+} ionlarının yüksək qatılığında onun RNT komponenti təklikdə *E. coli* pre-tRNT-ləri tanıya və kəsə bilir. RN-aza P polipeptidi RNT ilə doğranmanın sürətini artırır, doğranmaya Mg^{2+} ionlarının fizioloji qatılığında davam etməyə imkan verir. Bu cürə RN-aza P eukariotlarda da fəaliyyət göstərir.

Pre-tRNT-lərdə əsasların təxminən 10 faizi prosessinq zamanı fermentativ modifikasiya olunurlar. Əsasların modifikasiyasının üç sinifi baş verir (Şəkil 10-45):

1. pre-tRNT-nin 3′ sonluğunda U qalıqları CCA ardıcıllığı ilə əvəz olunur. CCA ardıcıllıq bütün tRNT-lərin 3′ sonluğunda tapılmışdır və onların zülal sintezi zamanı aminoasil-tRNT sintetaza vasitəsi ilə yüklənməsi üçün tələb olunur. tRNT sintezində bu mərhələ, görünür ki, keyfiyyət-nəzarəti nöqtəsi kimi fəaliyyət göstərir, çünki yalnız düzgün bükülmüş tRNT-lər CCA əlavə edən ferment tərəfindən tanınır.
2. Metil və izopentenil qruplar purin əsasların heterotsiklik halqasına əlavə olunurlar və spesifik qalıqlarda ribozada olan 2′-OH qruplar metilləşirlər.

Şəkil 10-45-də göstərildiyi kimi, mayada tirozin tRNT ($tRNT^{Tyr}$) genindən ekspressiya olunan pre-tRNT yetişmiş $tRNT^{Tyr}$-də olmayan 14-əsaslı introna malikdir. Bəzi başqa eukariotik tRNT genləri və bəzi arxea tRNT genləri də intronlara malik olurlar. Nüvə pre-tRNT-lərdə olan intronlar pre-mRNT-lərdə olan intronlardan qısadırlar və pre-mRNT-lərdə tapılan konsensus splays-sayt ardıcıllıqlarına (bax Şəkil 10-7) malik deyillər. Pre-tRNT intronları həmçinin, mitoxondri və xloroplast pre-rRNT-lərdə tapılmış daha uzun, özünü-splaysinq edən I qrup və II qrup intronlardan aydın şəkildə fərqlənirlər. Pre-tRNT splaysinqinin mexanizmi özünü-splaysinq intronların və splaysesomların mexanizmlərindən üç fundamental yolla fərqlənir (bax Şəkil 10-44). Birincisi, pre-tRNT-lərin splaysinqi RNT-lərlə deyil, zülallarla kataliz olunurlar. İkincisi, pre-tRNT intronlar, eyni zamanda intronun hər iki ucunda baş verən doğranma yolu ilə bir mərhələdə kəsilir. Nəhayət üçüncü, kəsilməklə intronun hər iki tərəfində əmələ gəlmiş tRNT yarım-hissələrinin birləşməsi üçün GTP və ATP hidrolizi tələb olunur.

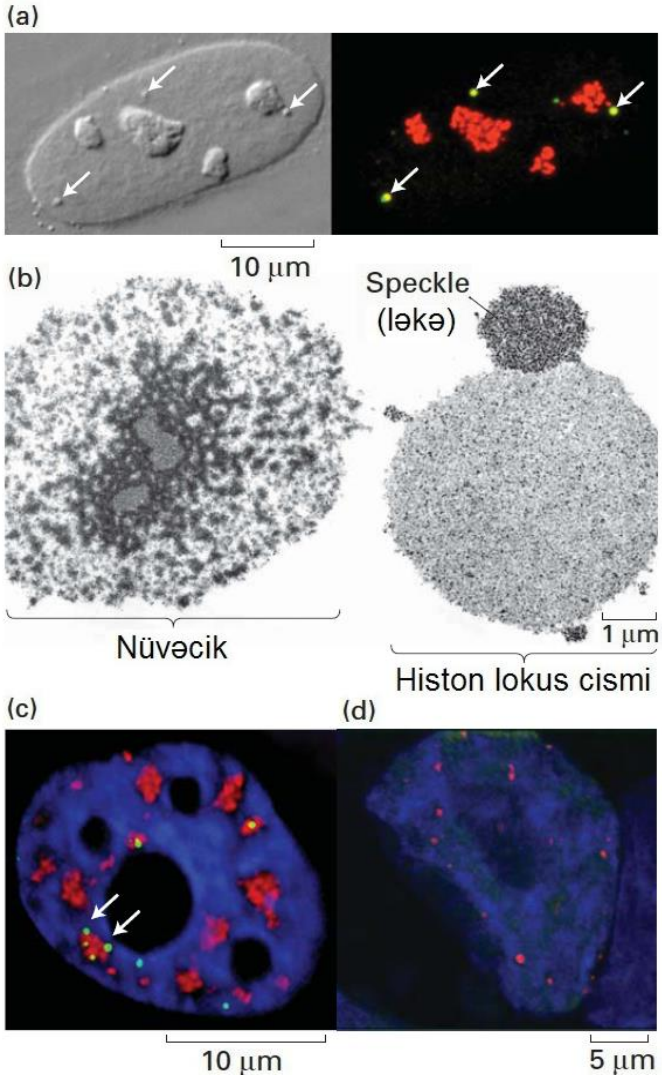
Pre-tRNT-lər nukleoplazmada prosess olunduqdan sonra yetkin tRNT-lər, tRNT-lərin nüvədən eksportuna həsr olunan eksportin, eksportin-t (bax Fəsil 13) vasitəsi ilə nüvə məsamələri komplekslərindən keçərək sitoplazmaya eksport olunurlar. Sitoplazmada tRNT-lər zülal sintezi zamanı (bax Fəsil 5), aminoasil tRNT sintetazalar, elonqasiya faktorları və ribosomlar arasından keçirlər. Beləliklə, tRNT-lər ümumiyyətlə, mRNT və rRNT-lərdə olduğu kimi, zülallarla əlaqəli olur və hüceyrədə çox az müddətdə sərbəst şəkildə olurlar.



ŞƏKİL 10-45 Tirozin pre-tRNT-nin prosessinqi zamanı baş verən dəyişikliklər. Antikodon ilgəkdə 14-nukleotid intron (mavi) splaysinqlə uzaqlaşdırılır. 5′ sonluqda 16 nukleotid ardıcıllıq (yaşıl) RN-aza P ilə kəsilir. 3′ sonluqda U qalıqları, yetkin tRNT-lərdə tapılan CCA ardıcıllıqla (qırmızı) əvəz olunur. Sütun ilgəkdə çoxsaylı əsaslar xarakterik modifikasiya olunmuş əsaslara (sarı) çevrilir. Prosessinq zamanı splays olunan intronlara bütün pre-tRNT-lər malik olmurlar, amma onların hamısı, burada göstərilmiş başqa dəyişikliklərə uğrayırlar. D = dihidrouridin; ψ – psevdouridin.

Nüvə Cismləri Funksiyaca İxtisaslaşmış Nüvə Domenləridir

Bitki və heyvan hüceyrəsi nüvəsinin elektron mikroskopu ilə və fluoressyent nişanlanmış anticismlərlə rənglənmə yolu ilə həyata keçirilən yüksək rezolyusiyalı vizuallaşdırılması nüvədə xromosom ərazilərində və nüvəcikdə domenləri aşkar etdi. **Nüvə cismləri** adlanan bu ixtisaslaşmış nüvə domenləri membranla əhatə olunmamışlar. Buna baxmayaraq, onlar nüvə daxilində fərqli, təxminən sferik quruluşlar yaradan zülalların və RNT-lərin yüksək qatılıqlı rayonlarıdırlar (Şəkil 10-46). Nüvədə ən çox məlum olan cism, əvvəldə müzakirə olunmuş, ribosomal subvahidlərin sintezi və toplanması saytları olan nüvəcikdir. Bir sıra başqa nüvə cismləri də quruluş tədqiqatları zamanı aşkar edilərək təsvir olunmuşdur. Fluoressent nişanlanmış nüvə



zülalları ilə aparılan eksperimentlər göstərdilər ki, nüvə yüksək dinamik mühütdir, burada zülallar nukleoplazmadan sürətlə diffuziya edirlər. Nüvə cismləri ilə assosasiyada olan zülallar tez-tez hallarda nukleoplazmada nüvə cismlərindən kənarda aşağı qatılıqda müşahidə olunurlar və fluoressent tədqiqatlar göstərdi ki, onlar diffuziya edərək nüvə cismlərinə daxil ola və oradan çıxa bilirlər. Nüvə cismləri, canlı hüceyrələrdə molekulyar mobilliyin ölçülmələrinə əsasən, yüksək qatılıqların özü-özünü-təşkil edən rayonlarını yaratmaq üçün kifayət qədər yüksək afinliklə qarşılıqlı təsirdə olan, amma bu quruluşların daxilinə və xaricinə diffuziya etmək qabliyyəti üçün bir-birinə qarşı kifayət qədər aşağı afinnlikdə olan, diffuziya edən spesifik zülalların gözlənilən sabit vəziyyəti kimi riyazi modelləşdirilə bilərlər. Bu quruluşlar elektron mikrofotosunda heterogen, qarşılıqlı təsirdə olan komponentlərin süngərşəkilli şəbəkəsi kimi görünürlər. Burada biz, nüvə cismlərinin bir neçə nümunəsini müzakirə edirik.

Kajal Cismlər Kajal cisimlər 0.2-1 µm ölçüdə olan sferik quruluşlar olub, bir əsirdən artıq öncə böyük nüvələrdə müşahidə olunmuşdur (Şəkil 10-46a). Müasir tədqiqatlar göstərir ki, nüvəcik kimi, Kajal cismlər də, splaysesomal snRNP-lər və başqa RNP-lərin RNP-komplekslərdə toplanması mərkəzidirlər.

ŞƏKIL 10-46 Nüvə cismlərinin nümunələri. (a) HeLa hüceyrə nüvələrində Kajal cismlər və nüvəcik. DIC mikroskopiya təsviri (*solda*) dörd nüvəciyi və üç Kajal cismi göstərir (oxbaşıları). Eyni nüvə koilinə (yaşıl) və fibrillarinə (qırmı) qarşı anticismlə immun rənglənədikdə (*sağda*), üç Kajal cism hər iki anticismlə rəngləndiyindən onlar sarı rəngdə görünürlər. Nüvəcik yalnız, nüvəcikdə olan rRNT-nin və Kajal cismlərdə snRNT-lərin 2′-*O*-metilləşməsinin metiltransferazası olan fibrillarinə g**ö**rə rənglənir. (b) Tək *Xenopus* oositinin nüvəsində nüvə cismlərinin transmissiyalı elektron mikrofotosu. Həddən artıq böyük oosit nüvəsinin yalnız bir hissəsi göstərilir. Histon lokus cismləri histon mRNT transkripsiyasının və prosessinqinin saytıdırlar. Onlar oositdə daha böyükdürlər və əksər onurğalıların hüceyrələrinə nisbətən həddən artıq böyük miqdarda histon mRNT-lərini istehsal edirlər. *Spekl* (*Ləkə*) bir yerə cəmlənmiş splaysinq faktorlarıdır. (c) DAPI ilə (mavi) rənglənmiş HeLa hüceyrəsi; xırda ləkələrdə saxlanılan splaysinq faktoru SC35-in (qırmızı) anticismi; və nüvə cismlərində, çox zaman spekllar (ləkələr) yaxınlığında müşahidə olunduğuna görə *paraspekllar* adlanan zülal PSPC1-in anticismi (ağ oxlar). (d) H1299 hüceyrələrin (ağciyər karsinoması hüceyrə xətti) nüvəsində tapılmış PML nüvə cismləri. DNT DAPI ilə (mavi) rənglənmişdir, PML nüvə cismləri isə bu hüceyrələrdəki əsas zülal olan PML anticismlə rənglənmişdir. [(a) hissəsi Macmillan Publishers Ltd., razılığı ilə Gall, J. G., "The centennial of the Cajal body," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*., 2003, **4**(12):975–980-dən yenidən çap olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc vasitəsilə alınmışdır. (b) hissəsi Elsevier, razılığı ilə Handwerger, K. E. and Gall, J. G., "Subnuclear organelles: new insights into form and function," *Trends Cell Biol*. 2006, **16**(1):19–26-dən yenidən çap olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc vasitəsilə alınməışdır. (c) hissəsi Fox, A. H., and Lamond, A. I., "Paraspeckles," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*., 2010, **2**(7):a000687. (d) hissəsi American Society for Microbiology, razılığı ilə Pennella, M. A., et al., "Adenovirus E1B 55-kilodalton protein is a p53-SUMO1 E3 ligase that represses p53 and stimulates its nuclear export through interactions with promyelocytic leukemia nuclear bodies," J. *Virol.,* 2010, **84**(23):12210–25 –dən yenidən çap olunur.]

rRNT-lər kimi, snRNT-lər də, spesifik uridin qalıqlarının psevdouridin qalıqlarına çevrilməsi və metil qrupunun spesifik ribozaların 2′-hidroksil qruplarına əlavə olunması kimi spesifik modifikasiyalara uğrayırlar. Bu posttranskripsiya modifikasiyaları pre-mRNT splaysinqində snRNP-lərin düzgün toplanması və fəaliyyəti üçün çox əhəmiyyətlidir. Bu modifikasiyalar Kajal cismlərdə baş verir, burada onlar *scaRNT-*

lər (kiçik Kajal cismlə-birləşmiş RNT-lər) adlandırılan snoRNT-yə-bənzər bələdçi RNT sinifi molekulları ilə yönəldilirlər. Həmçinin, sübut olunmuşdur ki, Kajal cismlər intronların buraxılması zamanı ayrılan sərbəst U4, U5 və U6 snRNP-lərdən pre-mRNT splaysinqində tələb olunan U4/U5/U6 tri-snRNP kompleksinin yenidən-toplanma saytıdır (bax Şəkil 10-11).

Histon Lokus Cismlər Histon lokus cismlər (Şəkil 10-46b) histon RNT sintezinin saytıdır. Onlar poli(a) quyruğu olmayan əsas histon mRNT-lərin xüsusi 3′-sonluq prosessinqində iştirak edən *U7 snRNP* qatılığına malikdirlər.

Nüvə Ləkələri (Nuclear Speckles) Nüvə ləkələri, snRNP zülallara və onurğalıların hüceyrəsinin nüvə plazmasında yayılmış, təxminən 25-50 qeyri müntəzəm, 0.5-2.0 μm diametrli amorf quruluşlar kimi pre-mRNT splaysinqində iştirak edən digər zülalların fluoressent nişanlanmış anticismlərindən istifadə etməklə müşahidə olunmuşlar (Şəkil 10-46c). Ləklər, xromatinlə sıx bağlı olan ko-transkripsiya pre-mRNT splaysinqi saytlarında yerləşmədiyindən, güman olunur ki, onlar snRNP-lərin və tələb olunan zaman nüvə plazmasına buraxılan və pre-mRNT splaysinqində iştirak edən zülalların saxlanma (anbar) rayonlarıdırlar.

Nüvə Paraspekllları Paraspekllar uzun zülal-kodlaşdırmayan RNT-lərin (lncRNT) nümayəndəsi NEAT1 ilə DBHS (Drosophila Davranışı İnsan Splaysinqi ─ Drosophila Behavior Human Splicing) zülallar ailəsinin nümayəndəsi P54NRB/NONO, PSPC1 və PSF/SFPQ arasında olan qarşılıqlı əlaqədən yaranan RNP-lərdən ibarətdirlər. Paraspekllar adenozindən-inozinə redaktəyə məruz qoyulmuş ikiqat RNT rayonlarına malik olan RNT-nin nüvə ləngidilməsi yolu ilə gen ekspressiyasının nəzarəti üçün kritik əhəmiyyətlidirlər. Bu yolla onlar, nüvədə fəaliyyət göstərən yaxşı başa düşülməyən RNT keyfiyyət-nəzarət mexanizmləri ilə fəaliyyət göstərə bilərlər.

Promyelositar Leykomiya (PML) Nüvə Cismləri. PML genlər ilk dəfə, nadir xəstəlik olan Promyelositar Leykomiya (PML) xəstələrin leykomik hüceyrələrində gen daxilində xromosom translokasiyalarını müşahidə edərkən aşkar olunmuşlar. İmmunfluoressyensiya mikroskopiya tədqiqatları zamanı PML zülallara spesifik anticismlərdən istifadə edilərkən, aşkar olunmuşdur ki, zülal məməlilərin hüceyrələrinin nüvəsində diametri 0.3-1 μm olan, təxminən sferik olan 10-dan 30-a yaxın rayonlarda lokalizasiya olunmuşdur. Güman olunur ki, bu PML nüvə cismlərinin çoxsaylı funksiyaları vardır, amma belə bir konsensus ortaya çıxır ki, onlar, DNT reparasiyasında və apoptozun induksiyasında iştirak edən zülal komplekslərinin toplanması və modifikasiyası saytları kimi fəaliyyət göstərirlər. Məsələn, aşkar olundu ki, əhəmiyyətli p53 şiş supressor zülalı PML nüvə cismlərində DNT zədələnmələrinə cavab olaraq fosforlaşma və metilləşmə kimi post-translyasiya modifikasiya olunur və onun gen məhsulu bu DNT zədələnməsini azaldan genlərin ekspressiyasının fəallaşmaq qabliyyətini artırır. PML nüvə cismləri həmçinin hüceyrənin DNT viruslarına qarşı, viruslarla yoluxmuş hüceyrələrin və immun cavab reaksiyasında iştirak edən T-limfositlərin (bax Fəsil 23) ifraz etdiyi interferon zülalları ilə induksiya olunan müdafiə sistemlərində də tələb olunurlar,.

PML nüvə cismləri həmçinin, modifikasiya olunmuş zülalların fəallığına və subhüceyrə lokalizasiaysına nəzarət edən, *SUMO1* (small *u*biquitin-like *m*oiety-1) adlanan ubikvitinə-bənzər zülalın əlavə olunması yolu ilə zülalların post-translyasiya modifikasiya olunma saytlarıdır. Çox transkripsiya aktivatorları sumoyilləşəndə ingibirləşirlər və onların sumoyilləşmə saytlarının mutasiya olunması onların transkripsiyanı stimullaşdırmasını fəallaşdırır. Bu müşahidələr göstərir ki, PML nüvə cismləri transpripsiyanın repressiyası mexanizmində iştirak edirlər, amma bu da hələ tam başa düşülməmişdir.

Nüvəciin Ribosomal Subvahidlərin Sintezindən Başqa Digər Fəaliyyətləri İlk müşahidə olunan nüvə cismləri - nüvəciklər, ola bilsin ki, subquruluşda ribosomun biogenezindən savayı başqa fəaliyyətlərə də həsr olunmuş ixtisaslaşmış rayonlara malikdir (bax Şəkil 10-46b). Sübut olunmuşdur ki, zülalların ifraz olunmasında və ER membrana daxil edilməsində iştirak edən siqnal tanıyan zərrəcik (SRP) (bax Fəsil 13) nüvəcikdə toplanır, sonra sitoplazmaya eksport olunur və orada onların tam yetişməsi baş verir. Maya hüceyrələrində mitozun son mərhələsindəki prosesləri tənzimləyən zülal fosfataza Cdc14 xromosomlar tumurcuqlara düzgün seqreqasiya olunana qədər müddətdə (bax Fəsil 19) nüvəcikdə tutulub saxlanılır. Bundan başqa, insan xərçəngində daha tez mutasiya olunan genlə kodlaşdırılan p53 zülalın tənzimlənməsində iştirak edən ARF adlanan şiş supressor zülalı, nüvəcikdə ifraz olunur və DNT zədələnmələrinə cavab olaraq buraxılır (bax Fəsil 24). Bunadn əlavə, heteroxromatin çox hallarda nüvəciyin səthində formalaşır (Şəkil 8-28), bu göstərir ki, nüvəciklə assosasiyada olan zülallar da repressiya olunmuş (sıxılmış) xromatin quruluşunun yaranmasında iştirak edirlər.

10.5 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSIYALARI

rRNT və tRNT-lərin Prosessinqi

- RNT polimeraza I ilə sintez olunan böyük sələf pre-rRNT (insanda 13.7 kə), ribosomal subvahidlərdə zülallarla birləşən yetkin 28S, 18S və 5.8S rRNT-ləri əmələ gətirmək üçün kəsilməyə, eqzonukleolitik doğranmaya və əsasların modifikasiyasına məruz qalır.
- Pre-rRNT-nin sintezi və proessinqi nüvəcikdə baş verir. Böyük ribosomal subvahidin 5S rRNT komponenti nukleoplazmada RNT polimeraza III vasitəsi ilə sintez olunur.
- SnoRNP-lərdə zülallarla birləşən, təxminən 150 snoRNP-lər pre-rRNT-lərdə spesifik saytlarla əsas cütü yaradırlar və onlar nüvəcikdə rRNT-nin prosessinqi gedişində ribozanın metilləşməsini, uridinin psevdouridinə modifikasiyasını və xüsusi saytların kəsilməsini istiqamətləndirilər.
- I qrup və II qrup özünü-splaysinq edən intronlar və yəqin ki, splaysesomlarda snRNT-lər hamısı ribozimlər kimi və ya katalitik fəal RNT ardıcıllıqları kimi fəaliyyət göstərirlər, birləşmiş Mg^{2+} ionlarını tələb edən analoji transefirləşmə reaksiyaları ilə splaysinqi həyata keçirirlər (bax Şəkil 10-44).
- Nukleoplazmada RNT polimeraza III ilə sintez olunan pre-tRNT-lər 5′-sonluqdakı ardıcıllığın kəsilib atılması, 3′ sonluğa CCA ardıcıllığın əlavə edilməsi və çoxsaylı daxili əsasların modifikasiya edilməsi ilə prosess olunur (bax Şəkil 10-45).
- Bəzi pre-tRNT-lər qisa introna malik olurlar, onların zülalla-kataliz olunan mexanizmlə kəsilib uzaqlaşdırılması pre-

mRNT-lərin və özünü-splays edən intronların istifadə etdiyi mexanizmdən fərqlənir.

- RNT molekullarının bütün növləri eksport olunduqdan sonra həm nüvədə həm də sitoplazmada müxtəlif tipli ribonukleozülal zərrəciklərin zülalları ilə assosasiya edirlər.
- Nuvə cismləri nüvədə fəaliyyətinə görə ixtisaslaşmış xüsusi rayonlar olub özünü-təşkil edən quruluş zülalları ilə qarşılıqlı əlaqəyə girirlər. Nüvəcik kimi, bunların çoxu RNP komplekslərin toplanması rayonlarıdırlar.

Açar Sözlər

5′ papaq
alternativ splaysinq
çarpaz-eqzon tanıma kompleksi
dəmirə-cavab element-birləşdirən zülal (IRE-BP)
Dicer
doğranma/poliadenilləşmə kompleksi
Drosha
eqzosom
I qrup intronlar
II qrup intronlar
kiçik nüvə RNT-ləri (snRNT-lər)
kiçik nüvəcik RNT-lər (snoRNT-lər)
qısa müdaxilə RNT-lər (sıRNT)
mikroRNT-lər (miRNT-lər)
mRNP eksporter
mRNT nəzarəti
nüvə məsamələri kompleksi (NPC)
poli(A) quyruq
pre-mRNT
pre-rRNT
ribozim
RNT ilə iduksiya olunan susma (silensing) kompleksi (RISC)
RNT interference (RNTi)
RNT redaktə olunması
RNT splaysinqi
siRNT nokdaun
splaysosomlar
SR zülallar

Konsepsiyalara Baxış

1. Zülal-kodlaşdıran genlərin üç tip post-transkripsiya tənzimlənməsini təsvir edin.
2. Düzdür ya səhvdir? CTD mRNT-yə spesifik olan mRNT-prosessinqi mərhələlərinə cavabdehdir, amma digər RNT formaları üçün yox. Bunun nə üçün səhv və ya düz olduğunu seçdiyinizi izah edin.
3. mRNT-də tapılmış, splaysinqin harada baş verəcəyini göstərən çoxsaylı konservativ ardıcıllıqlar vardır. Bu ardıcıllıqlar, eqzon-intron qovşaqlarına nisbətən haradadırlar? Bu ardıcıllıqların splaysinq prosesində əhəmiyyəti nədən ibarətdir? Bu əhəmiyyətli rayonlardan biri intronlarda tapılmış şaxələnmə nöqtəsi A-dır. Splaysinq prosesində şaxələnmə nöqtəsi A-nın rolu nədir və bu, 2′ və ya 3′ karbon atomlarının istənilən birində olan OH qrupu ilə həyata keçə bilərmi?
4. hnRNT, snRNT, miRNT, siRNT və snoRNT-lər arasında fərq nədən ibarətdir?
5. II qrup intron özünü-playsinq ilə splaysosomal splaysinq arasında mexaniki oxşarlıq nədən ibarətdir? Təkamüldə bunlar arasında qohumluq münasibətlərinin olmasının sübutu nədən ibarətdir?
6. Siz 10 eqzona, 9 introna və poliadenilləşmə konsensus ardıcıllığı olan 3′ UTR-a malik olan genin ardıcıllığını əldə etmisiniz. Beşinci intronda da poliadenilləşmə saytı vardır. Hər iki poliadenilləşmə saytının istifadə olunduğunu yoxlamaq üçün siz mRNT-ni ayırırsız və əzələ toxumasından ən uzun transkripti və bütün başqa toxumalardan ən qısa transkripti tapırsız. Bu müxtəlif transkriptlərin istehsalında iştirak edən mexanizm barədə fərziyyənizi deyin.
7. RNT redaktəsi tripanosomaların və bitkilərin mitoxondrilərində və xloroplastlarda, həmçinin nadir hallarda ali eukariotlarda baş verən ümumi prosesdir. RNT redaktəsi nədir və insanda sənədləşdirilmiş apoB nümunəsində o hansı üstünlükləri nümayiş etdirir?
8. DNT nüvədə tapıldığından, transkripsiya nüvədə baş verən prosesdir. Zülal sintezinə məsuliyyətli olan ribosomlar sitoplazmada tapılmlşlar. Nə üçün hnRNP-nin sitoplazmaya daşınması nüvə məsamələri kompleksi ilə məhdudlaşdırılır?
9. Nüvədə zülal kompleksi mRNT molekullarının sitoplazmaya daşınmasında cavabdehdir. Bu eksporteri təşkil edən zülalları təsvir et. mRNP və eksporterin sitozola yönəlmiş hərəkət mexanizmini hansı iki zülal qrupu həyata keçirir?
10. RNT nokdaun, gen ekspressiyasının tənzimlənməsini pozmaq (derqulyasiya) üçün metodlar arsenalında çox güclü vasitəyə çevrilmişdir. Gen ekspressiyasının necə nokdaun oluna biləcəyini qısaca təsvir et. İnsan hüceyrələrində siRNT-lər TSC1-ə hansı təsiri göstərəcəkdir?
11. Dicer fəallığında çatışmazlıq olan bitkilərin RNT viruslarla yoluxmaya nə üçün yüksək həssaslıq göstərmələrini düşünərək mülahizə edin.
12. mRNT-nin stabilliyi hüceyrədə zülal səviyyəsinin əsas tənzimləyicisidir. Üç mRNT parçalanması yolunun qısa təsvirini verin. Fərz edin ki, maya hüceyrələri DCP1 genində mutasiyaya malikdir, nəticədə papağın atılması fəallığı aşağı enir. Bu mutant hüceyrələrdə tapılmış P cismlərdə dəyişikliklərin yaranacağını gözləyirsinizmi?
13. İndi, mRNT-nin lokalizasiyası ümumi hadisə kimi görünür. mRNT lokalizasiyasının hüceyrə üçün hansı faydaları vardır? Bəzi mRNT-lərin spesifik subhüceyrə sahələrində toplanmaq üçün yönəldilməsi barədə hansı sübutlar vardır?

İstinadlar

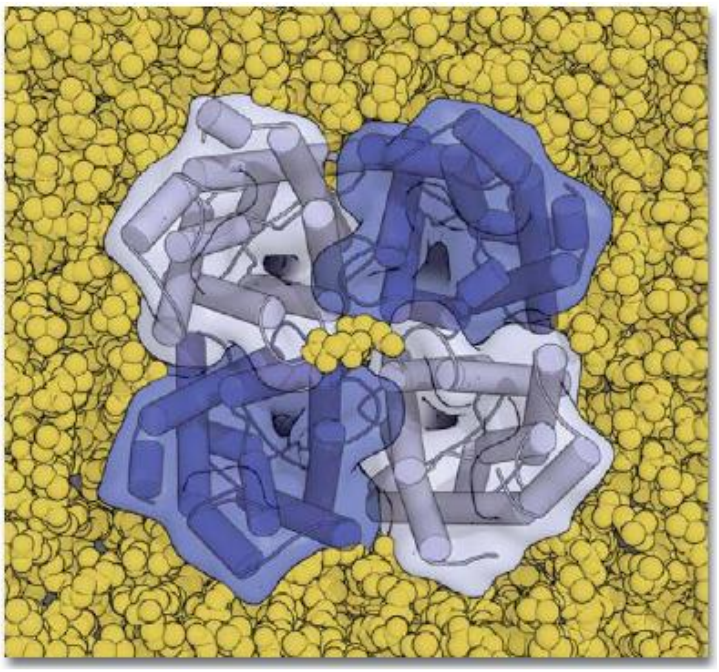
Eukariotik Pre-mRNT Prosessinqi
Bergkessel, M., G. M. Wilmes, and C. Guthrie. 2009. SnapShot: formation of mRNPs. *Cell* **136**:794.
Hocine, S., R. H. Singer, and D. Grunwald. 2010. RNA processing and export. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**(12):a000752.
Houseley, J., and D. Tollervey. 2009. The many pathways of RNA degradation. *Cell* **136**:763–776.
Lambowitz, A. M., and S. Zimmerly. 2004. Mobile group II introns. *Annu. Rev. Genet.* **38**:1–35.
Moore, M. J., and N. J. Proudfoot. 2009. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* **136**:688–700.
Sharp, P. A. 2005. The discovery of split genes and RNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* **30**:279–281.
Shi, Y., and J. L. Manley. 2015. The end of the message: multiple protein-RNA interactions define the mRNA polyadenylation site. *Genes Dev.* **29**:889–897.
Valadkhan, S. 2010. Role of the snRNAs in spliceosomal active site. *RNA Biol.* **7**:345–353.
Wahl, M. C., C. L. Will, and R. Luhrmann. 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**:701–718

Pre-mRNT Processinqinin Tənzimlənməsi
Licatalosi, D. D., and R. B. Darnell. 2010. RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. *Nat. Rev. Genet.* **11**:75–87.
Maniatis, T., and B. Tasic. 2002. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* **418**:236–243.
Raponi, M., and D. Baralle. 2010. Alternative splicing: good and bad effects of translationally silent substitutions. *FEBS J.* **277**:836–840.
Wang, E. T., et al. 2008. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**:470–476.
Zheng, S., and D. L. Black. 2013. Alternative pre-mRNA splicing in neurons: growing up and extending its reach. *Trends Genet.* **29**:442–448.
Zhong, X. Y., et al. 2009. SR proteins in vertical integration of gene expression from transcription to RNA processing to translation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**:424–436.

mRNT-nin Nüvə Qabığından Daşınması
Field, M. C., L. Koreny, and M. P. Rout. 2014. Enriching the pore: splendid complexity from humble origins. *Traffic* **15**:141–156.
Folkmann, A. W., et al. 2011. Dbp5, Gle1-IP6 and Nup159: a working model for mRNP export. *Nucleus* **2**:540–548.
Grunwald, D., R. H. Singer, and M. Rout. 2011. Nuclear export dynamics of RNA-protein complexes. *Nature* **475**:333–341.

Cytoplasmic Mechanisms of Post-transcriptional Control
Ambros, V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**:350–355.
Bar-Peled, L., and D. M. Sabatini. 2014. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol.* **24**:400–406.
Buchan, J. R., and R. Parker. 2009. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol. Cell* **36**:932–941.
Doma, M. K., and R. Parker. 2007. RNA quality control in eukaryotes. *Cell* **131**:660–668.
Ghildiyal, M., and P. D. Zamore. 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* **10**:94–108.
Ivshina, M., P. Lasko, and J. D. Richter. 2014. Cytoplasmic polyadenylation element binding proteins in development, health, and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**:393–415.
Jonas, S., and E. Izaurralde. 2015. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* **16**:421–433.
Kato, M., et al. 2012. Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell* **149**:753–767.
Martin, K. C., and A. Ephrussi. 2009. mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* **136**:719–730.

Processing of rRNA and tRNA
Handwerger, K. E., and J. G. Gall. 2006. Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends Cell Biol.* **16**:19–26.
Hopper, A. K., and H. Y. Huang. 2015. Quality control pathways for nucleus-encoded eukaryotic tRNA biosynthesis and subcellular trafficking. *Mol. Cell Biol.* **35**:2052–2058.
Januszyk, K., and C. D. Lima. 2014. The eukaryotic RNA exosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **24**:132–140.
Kressler, D., E. Hurt, and J. Bassler. 2010. Driving ribosome assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**:673–683.
Stahley, M. R., and S. A. Strobel. 2006. RNA splicing: group I intron crystal structures reveal the basis of splice site selection and metal ion catalysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**:319–326.
Turowski, T. W., and D. Tollervey. 2015. Cotranscriptional events in eukaryotic ribosome synthesis. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **6**:129–139



Suyun və qliserinin hüceyrənin xaricinə və daxilinə daşınmasını həyata keçirən bacterial akvaporin zülalın membrana (sarı) batmış görünüşü. Dörd eyni monomer açıq və tünd bənövşəyi rənglənmişlər, hər biri mərkəzində kanala malikdir. [Verilənlər D. Fu et al., 2000, *Science*, **290**:481-486, PDB ID 1fx8.]

FƏSİL

11

İonların və Kiçik Molekulların Transmembran Daşınması

Bütün hüceyrələrdə, plazma membranı sitoplazmanı xarici mühitdən ayıran keciricilik baryerini yaradır, beləliklə hüceyrənin fiziki və kimyəvi sərhədlərini müəyyən edir. Molekulların və ionların hüceyrənin daxilinə və xaricinə maneəsiz hərəkətinin qarşısını almaqla plazma membranı hüceyrəxarici mayenin tərkibi ilə sitozolun tərkibi arasındakı əhəmiyyətli fərqləri qoruyub saxlayır. Məsələn, heyvanlarda qanın və hüceyrəxarici mayenin tərkibində natrium xloridin (NaCl) qatılığı ümumiyyətlə 150 mM-dan yuxarı olur, çox ehtimal ki bu, bütün hüceyrələrin yarandığı dəniz suyunda tapılmış ~450mM Na^+ qatılığına oxşardır. Əksinə, natrium ionlarınəın (Na^+) sitozolda qatılığı on dəfə aşağıdır, təminən 15 mM olduğu halda, kalium ionlarının (K^+) qatılığı hüceyrə xaricinə nisbətən sitozolda daha yüksəkdir.

Sitozolu orqanoid daxilindən ayıran orqanoid membranı da keçiricilik baryeri yaradır. Məsələn, lizosom daxilində proton qatılığı, pH-5, sitozoldan təxminən 100 dəfə böyükdür, və çoxsaylı spesifik metabolitlər başqa orqanoidlərin, məsələn endoplazmatik şəbəkənin və ya Qolci aparatının daxilində sitozola nisbətən daha yüksək qatılıqda toplanırlar.

Bütün hüceyrə membranları, həm plazma həm də orqanoid membranları, tərkibinə digər lipidlər və spesifik tipli zülallar yüklənmiş fosfolipid ikiqatlısından təşkil olunmuşlar. Məhz zülalların və lipidlərin bu kombinasiyası membranlara fərqli keçiricilik keyfiyyəti verir. Əgər hüceyrə membranları təmiz fosfolipid ikiqatlısından təşkil olunmuş olsaydılar (bax Şəkil 10-4), onlar, virtual olaraq bütün ionları, amin turşularını, şəkərləri, başqa suda-həllolan molekullara keçirici olmayan əla kimyəvi baryer olardılar. Faktiki olaraq, yalnız çox az qazlar, və yüksüz, suda həllolan kiçik molekullar asanlıqla fosfolipid ikiqatlısından diffuziya edə bilirlər (Şəkil 11-1). Amma hüceyrə membranları yalnız baryer kimi fəaliyyət göstərməməlidirlər, onlar həmçinin, molekulların və ionların selektiv şəkildə membranın bir tərəfindən digər tərəfinə ötürülməsini həyata keçirən boru kimi fəaliyyət göstərməlidirlər. Məsələn, enerji-ilə zəngin qlükoza hüceyrənin daxilinə import olunmalıdır və tullantılar çıxarılmalıdır.

Virtual olaraq bütün kiçik molekulların və ionların hüceyrə membranından keçərək hərəkəti **membran nəqliyyat zülalları** – çoxsaylı transmembran domenləri ilə hüceyrə membranına batmış inteqral membran zülalları ilə həyata keçirilir. Bu membrana-sarınmış zülallar, molekulların və ionların membranın hidrofob özəyindən keçərək daşınması üçün şatl kimi, kanal kimi və ya nasos kimi fərqli fəaliyyətləri həyata keçirirlər. Bəzi hallarda, molekullar və ya ionlar yüksək qatılıqdan aşağı qatılığa daşınırlar, bu entropiyanın artması ilə gücləndirilən termodinamik cəhətdən əlverişli prosesdir. Buna misallar suyun və ya qlükozanın qandan bədənin əksər hüceyrələri daxilinə daşınmasıdır. Başqa hallarda, molekullar və ya ionlar nasosla aşağı qatılıqlardan yuxarı qatılıqlara vurulmalıdır, termodinamik cəhətdən sərfəli proses deyildir və yalnız xarici mənbədən olan enerjinin istifadəsi mümkün olduqda molekulların "yuxarıya", qatılıq qradientinin əksinə vurulması mümkün olur. Buna nümunə, lizosom lümenində aşağı pH yaratmaq üçün lizosom daxilində proton qatılığının artırılması qabliyyəti aiddir. Çox hallarda, molekul və ya ionlar membrandan keçərkən tələb olunan enerji, mexaniki olaraq ATP-də terminal fosfoanhidrid rabitəsinin enerji-buraxan hidrolizi ilə təmin olunur. Digər zülallar, bir molekulun və ya ionun onun qatılıq qradientinin əksinə hərəkətini başqa molekulun və ya ionun qatılıq qradienti istiqamətində hərəkəti ilə bağlayır, bir molekulun və ya ionun aşağıya hərəkətindən alınan enerşini başqa molekulun və ya ionun yuxarıya hərəkəti

QISA İCMAL

11.1 Transmembran Daşınmaya Ümumi Baxış

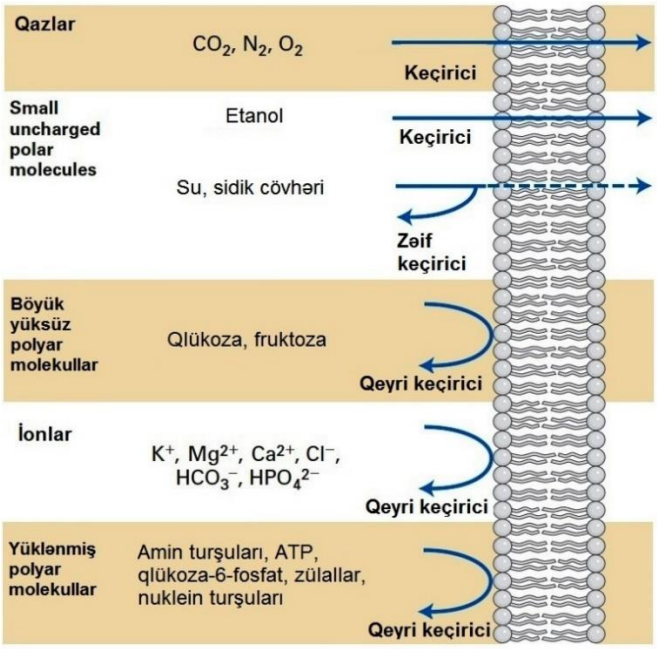
11.2 Qlükoza və Suyun Asanlaşdırılmış Daşınması

11.3 ATP-ilə İşləyən Nasoslar və Hüceyrədaxili İon Mühiti

11.4 Qapanmayan İon Kanalları və Sakitləşən Membran Potensialı

11.5 Simporter və Antiporterlərlə Birgə-Nəqliyyat

11.6 Transhüceyrə Nəqliyyatı



ŞƏKİL 11-1 Təmiz fosfolipid ikiqatlısının müxtəlif molekullara və ionlara nisbi keçiriciliyi. İkiqatlı çox sayda qazlara və çox az sayda kiçik, yüksüz, suda-həll olan (polyar) molekullara keçiricidir. O, suya çox az keçiricidir və ionlara və böyük polyar molekullara əhəmiyyətli dərəcədə qeyri keçiricidir

üçün istifadə edir. Istənilən hüceyrənin düzgün fəaliyyəti müxtəlif molekul və ionların bu cürə import və eksportunun düzgün tarazlanmasına əsaslanır.

Biz membran nəqliyyat zülalları üzrə öz müzakirəmizi, membrandan keçən nəqliyyatın əsas prinsiplərini nəzərdən keçirməklə və bu cürə zülalların üç əsas sinifini öz aralarında fərqləndirməklə başlayırıq. Sonraki bölmələrdə, hər bir sinifin xüsusi nümunələrinin quruluşunu və fəaliyyətini təsvir edirik və müxtəlif hüceyrə tiplərinin qanunauyğun fəaliyyətini mümkün edən homoloji nəqliyyat zülalları ailələrinin nümayəndələrinin necə müxtəlif xassələrə malik olduqlarını göstəririrk. Biz həmçinin izah edirik ki, həm plazma membranı həm də orqanoid membranları nəqliyyat zülallarının xüsusi kmbinasiyasına malikdirlər, bu da hüceyrə sitozolunda pH-ın saxlanılması, bitki hüceyrələrinin vakuolunda şəkərin və duzların toplanması, həm bitki həm də heyvanlarda suyun istiqamətlənmiş axını kimi əhəmiyyətli fizioloji proseslərin həyata keçirməsini mümkün edir. Hüceyrənin sakitlikdə olan membran potensialı membranı kəsib keçən selektiv ion nəqliyyatının əhəmiyyətli nəticəsidir və biz bu potensialın necə yarandığını öyrənirik. Kiçik bağırsağın daxili qatını əmələ gətirən epiteli hüceyrələri ionları, şəkərləri və digər kiçik molekulları və suyu hüceyrənin bir tətəfindən digər tərəfinə daşımaq üçün membran zülallarının kombinasiyasından stifadə edirlər. Bizim bu prosesi anlamağımızın idman içkilərinn və eləcə də vəba və ya digər diarheriya (ishal) xəstəliklərinə qarşı müalicənin inkişaf etdirilməsinə necə səbəb olduğunui görəcəyik.

Qeyd edək ki, bu fəsildə biz yalnız kiçik molekulların və ionların daşınmasını əhatə edirik, zülallar və oluqosaxaridlər kimi böyük molekulların daşınması Fəsil 13 və 14-də əhatə olunur.

11.1 Transmembran Daşınmaya Ümumi Baxış

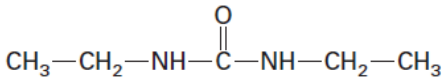
Bu bölmədə, biz əvvəlcə lipid membranların keçiriciliyinə təsir edən faktorları təsvir edəcəyik, sonra isə, ionların və kiçik molekulların membranı kəsib keçməsinə imkan yaradan membran nəqliyyat zülallarının üç əsas sinifinin qısaca təsvirini verəcəyik. Membrana batmış müxtəlif növ zülallar molekul və ionların keçirilməsini müxtəlif yollarla yerinə yetirirlər.

Yalnız Qazlar və Kiçik Yüksüz Molekullar Sadə Diffuziya ilə Membranı Keçirlər

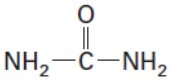
Fosfolipid ikiqatlısı özünün sıx hidrofob özəyi ilə suda-həll olan molekullara və ionlara qarşı əsasən qeyrikeçiricidir. Yalnız O_2 və CO_2 kimi qazlar və kiçik yüksüz polyar molekullar, məsələn sidik cövhəri və etanol asanlıqla **sadə diffuziya** yolu ilə fosfolipidlərdən və ya fosfolipid və xolesterindən yaradılmış süni membranı kəsib keçə bilirlər (bax Şəkil 11-1). Belə molekullar nəqliyyat zülallarının köməyi olmadan hüceyrə membranlarını da diffuziya edərək keçə bilirlər. Keçmə molekulların yüksək qatılığından aşağı qatılığına doğru kimyəvi qatılıq qradienti isttiqamətində getdiyindən heç bir metabolik enerjidən istifadə olunmur. Fəsil 2-də qeyd olunduğu kimi, belə keçmələr spontan olur, çünki onlar müsbət ΔS qiymətinə (entropiyanın artmasına) və uyğun olaraq mənfi ΔG qiymətinə (sərbəst enerjinin azalmasına) malikdirlər.

İstənilıən maddənin təmiz fosfolipid ikiqatlısını kəsib keçən diffuziya sürəti onun ikiqatlıdan keçən qatılıq qradientinə və onun hidrofobluğuna və ölçüsünə mütənasibdir, yüklü molekulların keçməsinə membranın elektrik potensialı da təsir edir. Təmiz fosfolipid ikiqatlısı iki su fazasını və ya "kompartmentini" ayırarkən membranın keçiriciliyi, kiçik miqdarda radioaktiv materialın bir kompartmentə əlavə edilməs və digərində onun görünmə sürətinin ölçülməsi ilə asanlıqla təyin edilə bilər. Maddənin qatılıq qradienti yüksək olduqca onun lipid ikiqatlısını kəsib keçməsi sürəti də də bir o qədər yüksək olur.

Maddənin hidrofobluğu onun ayrılma əmsalı *K*-nın ölçülməsi, yəni onun su ilə yağ arasında ayrılmasının tarazlıq sabitinin ölçülməsi ilə təyin olunur. Maddənin ayrılma əmsalı (suya nisbətən yağda olan fraksiyasının böyük olması) yüksək olduğca, onda lipidlərin həllolması da yüksək olur, ona görə də onun ikiqatlıdan keçmə sürəti də yüksək olur. Sadə diffuziya yolu ilə daşınmada ilkin və sürət-məhdudlaşdıran pillə, molekulun su məhlulundan, kimyəvi xassəsinə görə zeytun yağına bənzəyən fosfolipid ikiqatlısının hidrofob daxilinə keçməsidir. Bu səbəbdən də, molekul nə qədər hidrofob olarsa, o bir o qədər də sürətlə təmiz fosfolipid ikiqatlısından diffuziya edib keçir. Məsələn, hər bir azot atomuna birləşmiş etil qrupuna malik olan dietil-karbamiddə (dietil sidik cövhəri):



K= 0.01 olduğu halda, sidik cövhərində



K=0.0002-dir. Ona görə də, sidik cövhərindən 50 dəfə hidrofob olan dietilkarbamid (0.01/0.0002), fosfolipid ikiqatlısından ibarət olan membrandan 50 dəfə sürətlə diffuziya edəcək. Buna oxşar olaraq, daha uzun karbohidrogen zəncirinə malik olan yağ turşuları qısa cəncirli yağ turşularına nisbətən daha çox hidrofobdurlar və bütün qatılıqlarda fosfolipid ikiqatlısını daha tez diffuziya edib keçəcəklər.

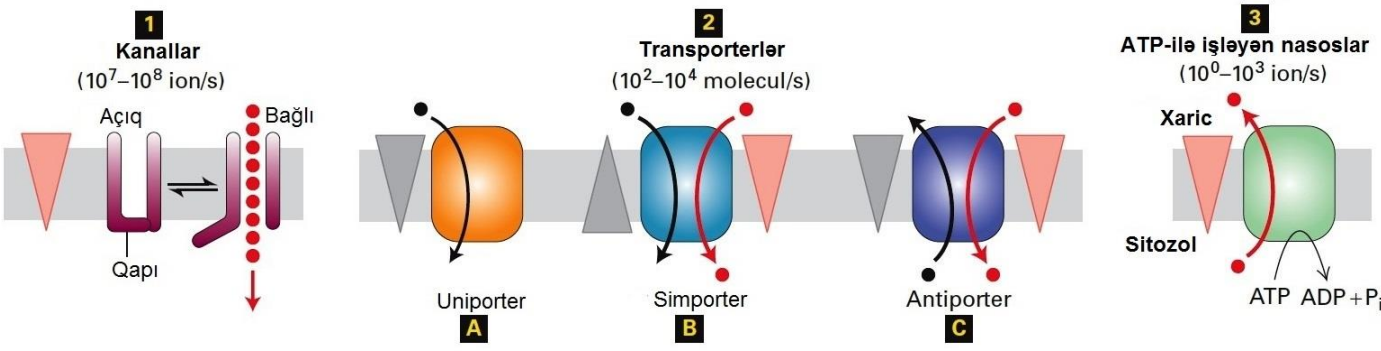
Əgər maddə xalis yükü daşıyırsa, onun membrandan keçən hərəkətinə həm onun qatılıq qradienti həm də **membran potensialı** – membrandan keçən elektrik potensialı (gərginlik) təsir edir. Bu iki qüvvənnin **elektrokimyəvi qradient** adlanan kombinasiyası yüklü molekulların membrandan keçən hərəkətinin energetik cəhətdən sərfəli istiqamətini müəyyən edir. Hüceyrə membranlarının əksəriyyətində mövcud olan, membran elektrik potensialı membranın iki tərəfində mənfi və müsbət yüklənmiş ionların qatılıqlarında baş verən kiçik qeyri-tarazlıq nəticəsində yaranır. Biz bu ion qeyri-tarazlığının və onun nəticəsində yaranan potensialın necə meydana gəldiyini və saxlanıldığını 11.4 və 11.5 bölmələrində müzakirə edirik.

Membran Zülallarının Üç Əsas Sinifi Molekul və İonları Hüceyrə Membranından Keçərək Daşıyır

Şəkil 11-1-dən aydın olduğu kimi, çox az molekul, sadə diffuziya yolu ilə təmiz fosfolipid ikiqatlısını lazımı dərəcədə keçə bilir, amma heç bir ion keçə bilmir. Beləliklə molekulların əksəriyyətinin hüceyrənin daxilinə və xaricinə daşınması xüsusi membran zülallarının köməyini tələb edir. Hətta, nisbətən böyük paylanma əmsalına malik olan molekullar (məsələn, sidik cövhəri, yağ turşuları) və CO_2 (karbon iki oksid) və NH_3 (ammonyak) kimi müəyyən qazlar olan hallarda daşınma çox zaman spesifik zülallarla sürətləndirilir, çünki sadə diffuziya hüceyrənin tələbatını ödəmək üçün kifayət qədər sürətlə baş vermir.

Bütün nəqliyyat zülalları, əsasən α spirallardan təşkil olunmuş çoxsaylı membrana-sarınan seqmentlərə malik olan transmembran zülallardır. Membranı kəsib keçən zülallardan təşkil olunmuş yolu yaratmaqla, guman olunur ki, nəqliyyat zülalları hidrofil maddələrin membranın hidrofob daxili ilə əlaqəyə girmədən keçməsinə imkan yaradır. Biz burada, membran nəqliyyat zülallarının bu fəsildə əhatə olunmuş üç əsas tipini təqdim edirik (Şəkil 11-2).

Kanallar suyu, spesifik ionları, və ya kiçik hidrofil molekulları membrandan keçərək onların qatılıqlarının və ya elektrik potensialı qradientlərinin *azalan* istiqamətində daşıyırlar. Bu proses enerji tələb etmədiyindən və nəqliyyat zülallarını tələb etdiyindən çox zaman bu "*passiv nəqliyyat*" kimi və ya "as*anlaşdırılmış diffuziya*" kimi, amma, çox zaman daha düzgün olaraq **asanlaşdırılmış nəqliyyat** kimi adlandırılır. Kanallar bir



ŞƏKİL 11-2 Membran nəqliyyat zülallarına ümumi baxış. Qradientlər ucu aşağı qatılıqlara, elektrik potensialına və ya hər ikisinə yönəlmiş üçbucaqlarla göstərilir. **1** Kanallar spesifik ionların (və ya suyun) onların elektrokimyəvi qradientinin aşağıya doğru hərəkətinə imkan yaradır. **2** Üç qrupa ayrılan transporterlər, spesifik kiçik molekulların və ya ionların hərəkətinə imkan yaradır. Yuniporterlər bir tip molekulları onların qatılıq qradientinin aşağıya doğru azalan istiqamətində hərəkət etdirilər **2A**. Birgə-nəqliyyat (kotransport) zülalları (simporterlər, 2B və antiporterlər, 2C) bir molekulun onun qatılıq qradientinin *əksinə* hərəkətini (qara dairələr), bir və ya daha artıq ionun hərəkətini elektrokimyəvi qradientin enən istiqamətində (qırmızı dairələr) idarə edərək kataliz edirlər. **3** Nasoslar, ionları və ya spesifik molekulları (qırmızı dairələr) elektrokimyəvi qradientin əksinə hərəkət etdirmək üçün ATP hidrolizindən yaranan enerjidən istifadə edirlər. Bu üç əsas sinif zülallar vasitəsi ilə nəqliyyat mexanizmlərindəki fərqlər, onların məhlulların daşınmasında fərqli sürətə malik olduqlarını göstərir.

çox su molekulu və ya ionların eyni anda, çox sürətlə hərəkət etdiyi, membrandan keçən hidrofil "boru" və ya keçidi əmələ gətirirlər. Bəzi kanallar çox zaman açıq olur, bu kanallara *qapanmayan* kanallar deyilir. Lakin, kanalların əksəriyyəti yalnız spesifik kimyəvi və ya elektrik siqnalları zamanı açılır. Bu kanallara *qapanan* kanallar deyilir, çünki zülal "qapı" alternativ olaraq kanalı ya qapayır ya da yoldan kənara çəkilərək kanalı açır (bax Şəkil 11-2). Bütün nəqliyyat zülallarında olduğu kimi kanallar da daşıdıqları molekullar üçün çox selektiv olurlar.

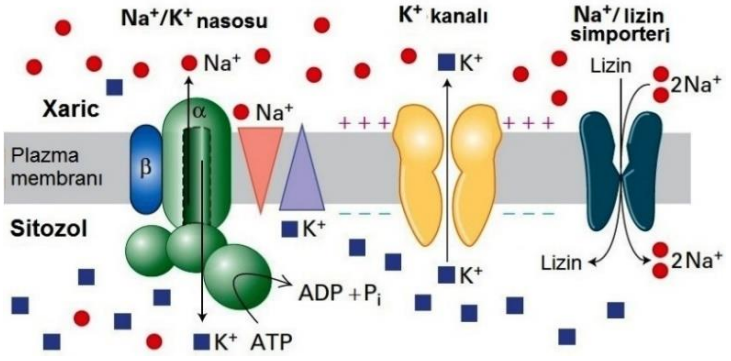
Transporterlər (həmçinin *daşıyıcılar* adlanır) çox geniş müxtəlifliyə malik olan ionları və molekulları hüceyrə membranından keçirərərək daşıyırlar, amma knallardan çox aşağı sürətlə. Üç tip transporterlər qeyd olunmuşlar. *Yuniporterlər* bir tip molekulu onun qatılıq qradientinin *azalan* istiqamətində daşıyır. Məməlilərin əksər hüceyrələrində, qlükoza və amin turşuları membranı yuniporterlərin köməyi ilə kəsib keçirlər (daşınırlar). Ümumilikdə kanallar və yuniporterlər çox zaman *asanlaşdırılmış transporterlər* kimi adlandırılır, bu qatılıq və ya elektrokimyəvi qradientin azalan istiqamətində hərəkəti göstərir.

Əksinə, *antiporterlər* və *simporterlər* bir tip ionun və ya molekulun onun qatılıq qradientinin *əksi istiqamətində* daşınmasını digər bir və ya daha artıq ionun eyni istiqamətdə (*simporter*) və ya əks istiqamətlərdə (*antiporter*) onların qatılıq qradientinin *aşağıya* (*azalan*) istiqamətindəki hərəkəti ilə bağlayır. Bu zülallar çox zaman, onların eyni zamanda iki və daha artıq məhlulların daşınmasında iştirakına görə *kotransporterlər* (*ko-daşıyıcılar*) adlandırılırlar.

ATP-ilə işləyən nasoslar (və ya sadəcə olaraq nasoslar) ATP-azalardır, ionların və molekulların membrandan keçərək kimyəvi qatılıq qradientinin və ya elektrik qradientinin və yaxud hər ikisinin əksinə daşınması üçün ATP hidrolizinin enerjisindən istifadə edirlər. **Fəal daşınma** kimi hesab edilən bu proses, cütləşmiş kimyəvi reaksiyalara (Fəsil 2) bir mnümunədir. Bu halda, ionların və ya kiçik molekulların "yuxarıya", enerji tələb edən elektrokimyəvi qradientin əksinə daşınması enerji azad edən ATP hidrolizi ilə birləşir. Burada ümumi reaksiya—ATP hidrolizi ilə ionların və ya kiçik molekulların "yuxarıya" daşınması — energetik cəhətdən əlverişlidir.

Kotransporterlər kimi, nasoslar cütləşmiş reaksiyalara vasitəlik edir, energetik cəhətdən qeyri səmərəli olan reaksiyaları (məsələn, bir tip ionun və ya molekulun qatılıq üzrə yuxarıya istiqamətdə daşınmasını) energetik cəhətdən səmərəli reaksiyalarla (digərinin isə aşağıya doğru daşınması ilə) birləşdirir. Amma qeyd etmək lazımdır ki, bu iki sinif zülallarla fəal daşınmanı həyata keçirən enerji ilə təmin edən reaksiyanın təbiəti fərqlənir. ATP-nasos ATP hidrolizindən ayrılan enerjidən idtifadə edir, halbuki, kotransporterlər elektrokimyəvi qradientdə saxlanılan enerjidən istifadə edirlər. Bu sonuncu proses bəzi hallarda *ikinci fəal daşınma* adlandırılır.

Bütün nəqliyyat zülallarının fəaliyyəti üçün konformasiya dəyişiklıiyi vacibdir. ATP ilə işləyən nasoslar və transporterlər konformasiya dəyişikliyi dövrəsinə uğrayaraq birləşmə mərkəzini (və ya mərkəzlərini) membranın bir tərəfində bir konformasiyaya, digər tərəfində isə ikinci konformasiyaya məruz qoyur. Hər bir belə dövrə, yalnız bir (və ya çox az) substrat molekulunun daşınmasına səbəb olduğundan, bu zülallar nisbətən aşağı sürətli nəqliyyat zülalları kimi xarakterizə olunurlar və saniyə ərzində 10^0-dan 10^4-ə qədər ionu və ya molekulu keçirirlər (bax Şəkil 11-2). İon kanallarının əksəriyyəti qapalı vəziyyətlə açıq vəziyyət arasında hərəkət edir, amma çox ionlar açıq kanaldan hər hansı bir konformasiya dəyişikliyi olmadan kəsib keçə bilirlər. Bu səbəbdən, kanallar nəqliyyatın çox yüksək sürəti ilə — 10^8 ion/sainiyə ilə xarakterizə olunurlar.



ŞƏKIL 11-3 Çoxsaylı membran transport zülalları metazoan hüceyrələrinin plazma membranında birgə fəaliyyət göstərirlər. Qradientlər, ucları aşağı qatılıqlara yönəlmiş üçbucaqlarla göstərilir. Na^+/K^+ ATP-aza plazma membranda Na^+-u hüceyrə xaricinə və K^+-u hüceyrə daxilinə vurmaq üçün ATP hidrolizindən ayrılan enerjidən istifadə edir. Bu, hüceyrə daxilinə nisbətən hüceyrə xaricində daha yüksək olan Na^+ qatılıq qradientini və hüceyrə xaricinə nisbətətn hüceyrə daxilində daha yüksək olan K^+ qatılıq qradientini yaradır. Müsbət yüklənmiş K^+ ionlarının membranın K^+ kanalı zülallarından keçərək hüceyrə xaricinə hərəkəti plazma membranından keçən elektrik potensialını yaradır – hüceyrəxarici üzə nisbətən sitozol üzü mənfi olur. Tipik natrium/amin turşusu ko-transporteri olan Na^+/lizin transporteri 2 Na^+ ionlarını bir lizinlə birlikdə hüceyrəxarici mühitdən hüceyrə daxilinə keçirir. Amin turşusunun qatılıq üzrə "yuxarıya" hərəkəti üçün tələb olunan enerji Na^+ ionlarının qatılıq üzrə "aşağıya" hərəkətindən ayrılan enerji ilə təmin olunur, hər ikisi daxilə-nisbətən-xaricdə-yüksək olan Na^+ qatılığı qradientinin hesabına və müsbət yüklənmiş Na^+ ionunu cəzb edən hüceyrə membranı daxilində olan mənfi potensial hesabına təmin olunur. Amin turşularını qəbul etmək üçün əsasc enerji mənbəyi ATP-nin Na^+/K^+ ATP-aza ilə hidrolizindən gəlir, çünki nasos həm Na^+ ionlarının qatılıq qradientini, həm də K^+ kanalı yol ilə membran potensialını yaradır və bunların hər ikisi birlikdə Na^+ ionlarının daxilə axınını təmin edir.

Tez-tez hallarda, bir sıra müxtəlif tipli daşıyıcı (transport) zülallar fizioloji funksiyalara nail olmaq üçün birgə fəaliyyət göstərirlər. Buna nümunə Şəkil 11-3-də görünür, burada ATP-aza nasosu Na^+ ionunu hüceyrədən kənara, K^+ ionunu isə hüceyrə daxilinə vurur, virtual olaraq bütün metazoan hüceyrələrində tapılan bu nasos, Na^+ və K^+ ionlarının plazma membranından kəsib keçən əksinə yönəlmiş qatılıq qradiebtini təşkil edir (K^+ nisbətən yuxarı qatılığı hüceyrə daxilində və Na^+ isə hüceyrə xaricində), bu da amin turşularının daxilə daşınmasını enerji ilə təmin edir. İnsan genomu yüzlərlə müxtəlif tipli nəqliyyat zülallarını kodlaşdırır, bunlar da, plazma membranından keçən Na^+ qatılıq qradienrinin və bununla əlaqəlıi olan elektrik potensialının enerjisindən geniş müxtəliflikdə molekulların öz qatılıq qradientlərinin əksi istiqamətində hüceyrə daxilinə daşınmasında istifadə edirlər.

CƏDVƏL 11-1 İonların və kiçik molekulların hüceyrə membranından keçərək daşınması mexanizmi

Xassələr	Sadə diffuziya	Vasitələnən nəqliyyat	Fəal nəqliyyat	Ko-nəqliyyat*
Spesifik zülalları tələb edir	-	+	+	+
Məhlul öz qradientin əksinə daşınır	-	-	+	+
ATP hidrolizi ilə birləşir	-	-	+	-
Azalan qradient istiqamətində birgə daşınan ionların hərəkətinin idarə olunması	-	-	-	+
Daşınan molükulların nümunələri	O_2, CO_2, steroid hormonlar, çox sayda dərmanlar	Qlükoza və amin turşuları (importerlər); ionlar və su (kanallar)	İonlar, kiçik hidrofil molekullar, lipidlər (ATP ilə təmin olunan nasos)	Qlükoza və amin turşuları (simporterlər); müxtəlif ionlar və saxaroza (antiporterlər)

* *İkinci fəal daşınma* kimi də adlanır

Cədvəl 11-1, kiçik molekulların və ionların hüceyrə daxilinə daşınmasının dörd mexanizmini ümumiləşdirərək verir. Növbəti bölmədə biz, qlükoza və suyun hüceyrə daxilinə daşınmasını həyata keçirən bəzi daha sadə membran nəqliyyat zülallarına baxacağıq.

11-1 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Transmembran Daşınmaya Ümumi Baxış

- Hüceyrə membranları, ionların və molekulların hüceyrənin daxilinə və xaricinə və onların orqanoidlərinə daşınmasını tənzimləyirlər. Maddələrin membrandan keçən sadə diffuziyasının sürəti onların qatılıq qradientinə və hidrofobluğuna mütənasibdir.
- Qazlar (məsələn, O_2 və CO_2) və kiçik yüksüz suda həll olan molekullar istisna olmaqla, əksər molekullar fosfolipid ikiqatlıəsını diffuziya yolu ilə, hüceyrənin tələbinə uyğun olan sürətlə kəsib keçə bilmir.
- Membran nəqliyyat zülalları molekulların və ionların membranın hidrofob daxilini kəsib keçməsi üçün hidrofil keçid yollarını təmin edirlər.
- Üç sinif transmembran zülal ionların, şəkərlərin, amin turşularının və başqa metabolitlərin hüceyrə membranından daşınmasını həyata keçirirlər: kanallar, daşıyıcılar (transporterlər) və ATP ilə işləyən nasoslar (bax Şəkil 11-2).
- Kanallar, su və ionların qatılıq qradientinin *azalan* istiqamətində *aşağıya* hərəkət etdiyi hidrofil "borunu" yaradırlar, bu proses vasitələnən nəqliyyat kimi və ya asanlaşdırılmış diffuziya kimi məlumdur.
- Daşıyıcılar (transporterlər) üç qrupa bölünürlər: Unuporterlər molekulları qatılıq qradientinin azalan istiqamətində daşıyırlar (asanlaşdırılmış daşınma); simporterlər və antiporterlər substratın öz qatılıq qradientinn əksinə olan hərəkətini ikinci substratın qatılıq qradientinin azalan istiqamətdə aşağıya hərəkəti ilə bağlayır, proses ikinci fəal daşınma və ya birgə-daşınma (kotransport) kimi məlumdur (bax Cədvəl 11-1).
- ATP-ilə işləyən nasoslar substratların öz qatılıq qradientinin *əksinə* hərəkətini ATP hidrolizi ilə bağlayır, bu proses fəal nəqliyyat kimi məlumdur.
- Konformasiya dəyişikliyi bütün membran nəqliyyat zülallarinin fəaliyyəti üçün çox vacibdir, daşınmanın sürəti zülalı bir dəfəyə kəsib keçən substrat molekullarının sayından asılıdır.

11.2 Qlükoza və Suyun Asanlaşdırılmış Daşınması

Heyvan hüceyrəlrinin çoxu ATP sintezi üçün qlükozanı substrat kimi istifadə edir, onlar adətən qlükozanı qandan və ya başqa hüceyrəxarici mayedən götürmək üçün qlükoza yuniporterindən istifadə edirlər. Çox hüceyrələr, suyun membranlardan keçən sürətini artırmaq üçün, akvaporinlər adlandırılan kanala-oxşar membran daşıyıcı zülallarından istifadə edirlər. Burada biz, bu və digər asanlaşdırılan daşıyıcıların quruluş və fəaliyyətlərini müzakirə edirik.

Yuniport Daşınma Sadə Diffuziyaya Nisbətən Sürətli və Daha Çox Spesifikdir

Qlükoza kimi və ya başqa hidrofil molekullar kimi bir tip molekulun qatılıq qradientinin azalan istiqamətində hüceyrə membranından keçərək zülalla-vasitələnən daşınması **yuniport** adlandırılır. Bir sıra xüsusiyyətlər yuniportu sadə diffuziyadan fərqləndirir:

1. Substratın yuniporterlərlə daşınma sürəti sadə diffuziya yolu ilə təmiz fosfolipid ikiqatlısından keçən daşınmadan çox-çox yuxarıdır.

2. Daşınan molekul membran ikiqatlısının hidrofob özəyinə heç zaman daxil olmadığından onun paylanma (bölünmə) əmsalı K əhəmiyyətsiz olur.

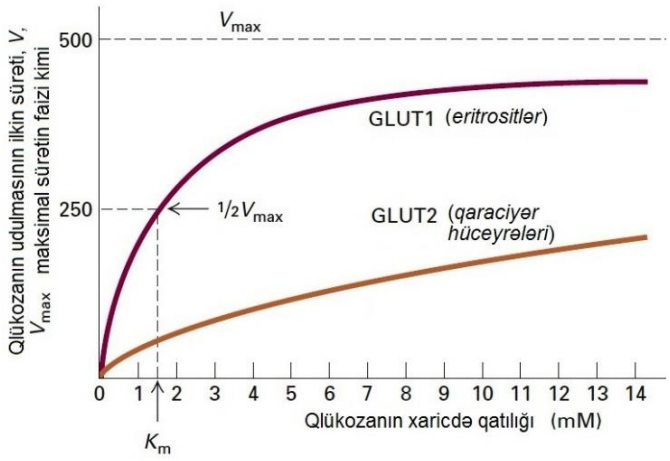
3. Daşınma məhdud sayda yuniporter molekulları vasitəsi ilə baş verir. Uyğun olaraq, daşınma sürəti maksimum, V_{max} olur, bu da membranda importerlərin sayından asılıdır. Membrandan keçən

qatılıq qradienti çox yüksək olduqda və hər bir yuniporter maksimal sürətlə işlədikdə V_{max} əldə edilir.

4. Daşınma geriyə dönəndir və qatılıq qradientinin istiqaməti dəyişiləndə daşınmanın istiqaməti də dəyişir.

5. Daşınma spesifikdir. Hər bir yuniporter yalnız tək bir tip molekulu və ya bir-birinə çox yaxın, oxşar olan molekullar qrupunu daşıyır. Transporterlərin substratlarına olan afinlik ölçüsü K_m, daşınma maksimumun yarısına çatarkən substratın qatılığıdır.

Bu xassələr Şəkil 11-2-də təsvir olunan başqa sinif zülallar vasitəsilə daşınmalara da aid edilə bilər.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 11-4 Hüceyrənin qlükozanı GLUT zülallar vasitəsi ilə udması sadə fermentativ kinetikanı nümayiş etdirir. Qlükozanın udulmasının başlanğıc sürəti *v* (hüceyrələrdə bir saatda millilitrdə olan mikromollarla ölçülür), birinci bir neçə saniyə ərzində, hüceyrəxarici mühitdə qlukozanın qatılığının artmasına qarşı maksimum sürətinin V_{max} faizi kimi plotlaşdırılır. Bu eksperimentdə qlükozanın hüceyrədə başlanğıc qatılığı həmişə sıfır olur. Həm eritrositlərdə ekspressiya olunan GLUT1 həm də qara ciyər hüceyrələrində ekspressiya olunan GLUT2 qlukozanın udulmasını kataliz edir. Fermentlərlə kataliz olunan reaksiya kimi, qlükozanın GLUT-la vasitələnən udulması maksimum sürəti (V_{max}) nümayiş etdirir. K_m, qlükozanın udulması sürətinin maksimumun yarısında olan qatılığıdır. GLUT2 təxminən 20 mM olan K_m qiymətində (göstərilmir) GLUT1-in təxminən 1.5 mM olan K_m qiymətinə nisbətən qlükozaya qarşı çox aşağı afinliyə malik olur.

Çox yaxşı öyrənilmiş yuniporterlərdən biri, məməlilərin əksər hüceyrələrinin plazma membranında tapılan *GLUT1* adlanan qlükoza daşıyıcısıdır (transporterdir). GLUT1 xüsusən də eritrositlərin plazma membranında zəngindir. Bu hüceyrələr yalnız bir membrana malik olduğundan, nə nüvəyə nə də başqa daxili orqanoidlərə mlik olmadığından (bax Şəkil 7-7a), onların plazma-membranı nəqliyyat zülallarının ayrılması və təmizlənməsi kifayət qədər sadədir. Ona görə də, yetkin eritrositlərdən alınmış GLUT1-in və çox sayda başqa nəqliyyat zülallarının xassələri geniş şəkildə öyrənilmişdir. Bundan başqa, insanın GLUT1 zülalının üç-ölçülü quruluşu 2014-cü ildə öyrənilmiş və GLUT1 funksiyasının ətraflı molekulyar əsaslarında yeni bilikləri təmin etmişdir.

Şəkil 11-4 göstərir ki, eritrositlər və qaraciyər hüceyrələri ilə qlükozanın udulması bir substratın daxil olduğu sadə fermentlə-kataliz olunan reaksiya oxşar kinetikanı nümayiş etdirir. Başqa zülal tipləri ilə vasitələnən daşınma reaksiyalarının kinetikası yuniporterlərlə daşınmaların kinetikasına nisbətən daha mürəkkəbdir. Buna baxmayaraq, bütün zülalla-vasitələnən nəqliyyat reaksiyaları membran ikiqatlısından keçən sadə diffuziyaya nisbətən daha çox sürətlə baş verirlər, substrat-spesifikdirlər və maksimal sürəti (V_{max}) nümayiş etdirirlər.

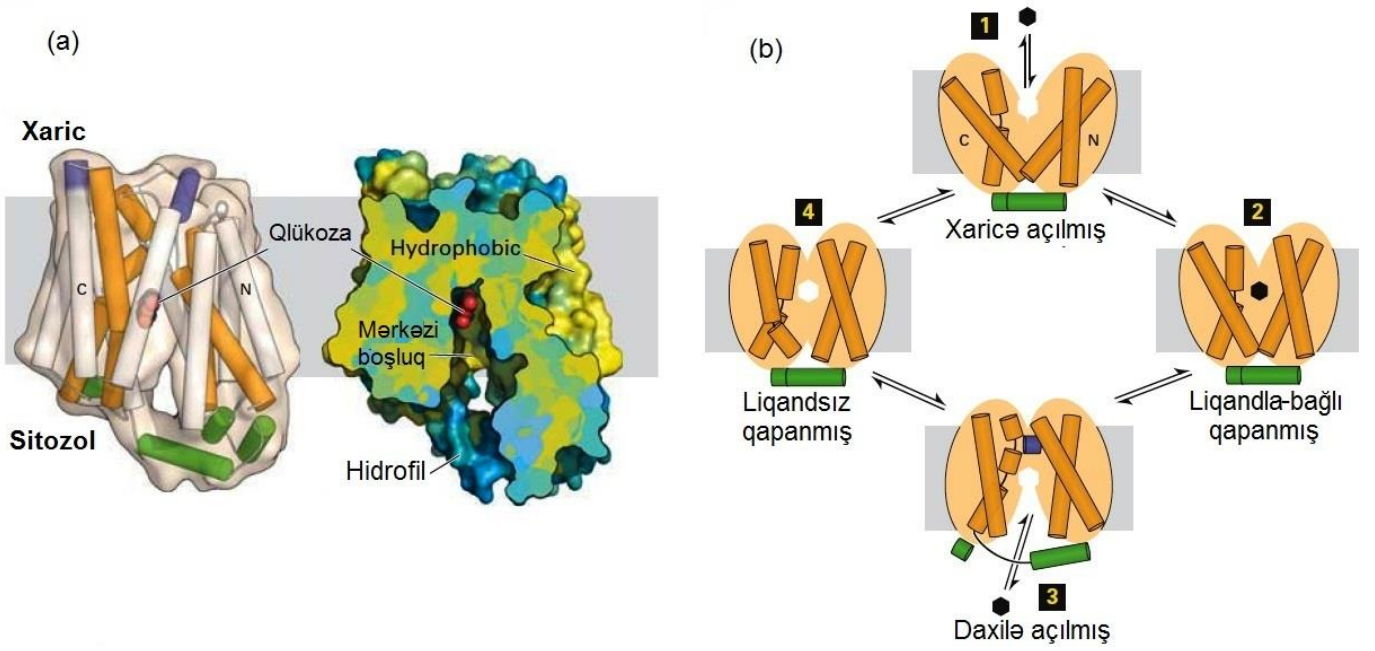
GLUT1 Yuniporterin Aşağı K_m-i Qlükozanın Əksər Məməli Hüceyrələrinin Daxilinə Daşımasını Mümkün Edir

Başqa yuniporterlər kimi, GLUT1 iki konformasiya vəziyyəti arasında növbələşir: birində, qlükoza-birləşən mərkəz hüceyrənin xaricinə tərəf baxır, digərində isə, qlükoza-birləşən mərkəz sitozola baxır. Sonuncu konformasiya Şəkil 11-5-də göstərildiyi kimi, yüksək rezolyusiyada təyin edilmişdir. Adətən qlükozanın qatılığı hüceyrəxarici mühitdə (eritrositlərdə olarkən qanda) hüceyrəyə nisbətən yüksək olduğundan GLUT1 yuniporter əsasən qlükozanın hüceyrəxarici mühitdən hüceyrəyə xalis inportunu kataliz edir. Şəkil 11-5b dəyişən giriş modeli kimi tanınan mexanizm vasitəsi ilə qlükozanın hüceyrə xaricindən hüceyrə daxilinə, sitozola biristiqamətli daşınması zamanı hadisələrin ardıcıllığını göstərir. Qlükozanın qatılığı hüceyrə daxilində hüceyrə xaricinə nisbətən yüksək olduqda GLUT1 qlükozanın sitozoldan hüceyrəxarici mühitə xalis eksportunu da kataliz edə bilir.

Qlükozanın hüceyrə xaricindən hüceyrə daxilinə GLUT1 ilə biristiqamətli daşınmasının kinetikası fermentlə-kataliz olunan sadə kimyəvi reaksiyada istifadə olunan eyni bərabərliklə təsvir oluna bilər. Sadəlik üçün belə hesab edək ki, qlükoza substratı S, ilkin olaraq yalnız hüceyrə xaricində mövcuddur; bunu yalnız hüceyrəni qlükoza olmayan mühitdə inkubasiya etməklə almaq mümkündür, bu zaman daxili qlükoza ehtiyatları sərf olunub qurtarır. Bu halda biz yaza bilərik:

$$S_{xaric} + GLUT1 \overset{K_m}{\Longleftrightarrow} S_{xaric} - GLUT1 + \overset{V_{max}}{\Longleftrightarrow} S_{daxil} + \\ + GLUT1$$

burada S_{xaric} – GLUT1 xaricə-baxan konformasiyada qlükoza ilə birləşmiş GLUT1-i göstərir. Bu bərabərlik, zülalın bir substrata birləşdiyi və onu başqa molekula çevirdiyi sadə fermentlə-kataliz olunan reaksiyanın getdiyi yolu ifadə edən bərabərliyə bənzəyir. Amma, burada GLUT1-birləşmiş şəkərdə heç bir kimyəvi modifikasiya baş vermir, əksinə o hüceyrə membranını kəsib keçərək hərəkət edir. Bununla belə, bu daşınma reaksiyasının kinetikası, sadə fermentlə-kataliz olunan reaksiyanın kinetikasına oxşardır və biz, GLUT1 ilə kataliz olunan S-ın hüceyrə daxilinə ilkin daşınma sürəti υ_0 üçün aşağıdakı ifadəni almaqdan ötrü Fəsil 3-dəki Mixayles-Mentes tənliyində olan eyni törəməni istifadə edə bilərik:



ŞƏKİL 11-5 İnsanın GLUT1 yuniporteri qlükozanı hüceyrə membranından keçərək daşıyır. (a) İnsanın tam uzunluqlu GLUT1 zülalının daxilə tərəf açıq konformasiyada quruluş modeli (yandan görünüş). Transporter 12 transmembran α spiral seqmentlərindən ibarət olub, hər biri üç transmembran α spiral cütündən qurulmuş amin-sonluq və karboksil-sonluq domenlərindən təşkil olunmuşdur. Dörd üç-spirallı təkrarların bir dəstində müvafiq transmembran seqmentlər soldakı modeldə narıncı rəngdə göstərilmişdir. Uyğun olaraq, yaşıl və bənövşəyi rənglərdə göstərilən amin-sonluq və karboksil-sonluq domenləri hüceyrəxarici və hüceyrədaxili α spirallarla əlaqələnmişdir. Səth elektrostatik potensialın kəsilmiş-açıq görünüşünün bir bölməsi membrandan qlükozanı keçirib daşıyan mərkəzi böşluğu göstərir. Rənglər amin turşularının hidrofobluğunu təmsil edir, hidrofobluq sarı, hidrofillik isə mavi rənglərdir. (b) GLUT1-in işləyən modeli. Bu dəyişkən giriş modelində, GLUT1-in xaricə-baxan konformasiyası qlükoza ilə birləşir (pillə 1) və liqand-birləşmiş qapalı konformasiyaya keçir (pillə 2), ardınca daxilə-açılmış konformasiyaya (pillə 3) keçir və qlükozanı sitoplazmaya çatdırır, sonra liqandsız qapalı konformasiyaya qayıdaraq birləşmə mərkəzi yenidən hüceyrə xaricinə baxır (pillə 4) və qlükozanın hüceyrə xaricindən daxilinə daşınmasının yeni dövrəsinə başlayır. Əgər qlükozanın qatılığı hüceyrə daxilində xaricinə nisbətən yüksəkdirsə, o zaman dövrə geriyə istiqamətdə (pillə 4 →pillə 1) işləyəcək, qlukozanın hüceyrədən təmiz çıxarılması ilə nəticələnəcək. Faktiki konformasiya dəyişikliyi burada göstəriləndən kiçik olur. [(a) hissə verilənləri D. Deng et al., 2014, *Nature* **510**:121–125, PDB ID 4pyp-dən.]

$$v_0 = \frac{V_{max}}{1+\frac{K_m}{C}} \qquad (11\text{-}1)$$

burada C, S_{xaric}-in qatılığıdır (ilkin olaraq, S_{daxil} = 0 qatılığı). V_{max}, bütün GLUT1 molekulları ona birləşmiş S olan halda daşınma sürətidir, son dərəcə yüksək S_{xaric} qatıllğında baş verir. K_m-in aşağı qiyməti substratın daşıyıcıya daha sıx birləşməsi zamanı yaranır. 11-1 bərabərliyi qlükozanın eritrositlərlə Şəkil 11-4-də göstərilmiş udulması əyrisini və eləcədə başqa yuniporterlərin oxşar əyrilərini təsvir edir.

İnsanın eritrosit membranında GLUT1 qlükoza daşıyıcının K_m qiyməti 1.5 mM bərabərdir. Beləliklə, qlükozanın hüceyrəxarici qatılığı 1.5 mM olduqda təxminən GLUT1 daşıyıcının yarısı xaricə baxan birləşmə mərkəzləri ilə qlükozaya birləşəcəklər və daşınma maksimal sürətin 50 faizi ilə gedəcək. Qanın qlükoza qatılığı normal halda 5 mM olduğundan eritrositlərin qlükoza daşıyıcıları, 11-1 bərabərliyindən göründüyü kimi, bir qayda olaraq, maksimal sürətin 77 faizində işləyir. GLUT1 daşıyıcı (və ya çox oxşar olan GLUT3 qlükoza daşıyıcısı) qlükozanı qandan daima arası kəsilmədən yüksək sürətlə götürən bütün bədən hüceyrələrində ekspressiya olunur, belə hüceyrələrin qlükoza udması sürəti qanda qlükozanın qatılığının kiçik dəyişilməsindən asılı olmayaraq yüksək qalır, çünki qanın qatılığı K_m-dən çox yüksək olur və hüceyrədaxili qlükozanın qatılığı metabolizmlə aşağı səviyyədə saxlanılır.

Qlükozadan əlava, konfiqurasiyasında şəkərin bir karbon atomuna görə D-qlükozadan fərqlənən izomerləri, D-mannoza və D-qalaktoza GLUT1-lə çox kiçik sürətlə daşınırlar. Amma, qlükoza üçün K_m (1.5 mM) onun D-mannoza üçün (20 mM) və ya Dqalaktoza üçün (30 mM) olan qiymətindən çox aşağıdır. Beləliklə GLUT1, başqa substratlara nisbətən normal substrat D-qlükozaya çox yüksək affinlik (aşağı K_m-lə göstərilir) göstərməklə kifayət qədər yüksək spesifikliyə malikdir.

GLUT1 eritrositlərin plazma membraninda zülalların 2 faizini təşkil edir. Qlükoza eritrositə daşındıqdan sonra o sürətlə fosforlaşır və hüceyrəni tərk edə bilməyən qlükoza-6-fosfatı əmələ gətirir. Qlükozanın metabolizminin birinci mərhələsi olan bu reaksiyaya (bax Şəkil 12-3) çox tez və konstant şəkildə baş verdiyindən, hətta qlükoza hüceyrəxarici mühitdən import olunsa da belə qlükozanın hüceyrədaxili qatılığı aşağı səviyyədə saxlanılır. Bunun nəticəsində qlükozanın qatılıq qradienti (hüceyrənin xaricində daxilinə nisbətən yüksəkdir) əlavə qlükoza molekullarının sürətli importunu fasiləsiz şəkildə təmin etmək üçün və hüceyrə metabolizminə lazım olan qədər qlükozanı təmin etmək üçün kifayət qədər yüksək səviyyədə saxlanılır.

İnsan Genomu Şəkər-Daşıyan GLUT Zülallarını Kodlaşdırır

İnsan genomu yüksək homologiyaya malik olan ən azı 14 GLUT zülalını, GLUT1 – GLUT14 kodlaşdırır və guman olunur ki, bunların hamısı 12 membrana-sarınan α spirala malikdir, bu da göstərir ki, onların hamsı bir əcdad daşıyıcı zülaldan törəmişdir. İnsanın GLUT1 zülalında transmembran α spiralda hidrofob aminturşu qalıqları böyük üstünlük təşkil edirlər, amma bir sıra spirallar, yan zəncirləri qlükozanın hidroksil qrupları ilə hidrogen əlaqəsi əmələ gətirən amin turşularını daşıyırlar (məsələn, serin, treonuin, asparagin və qlutamin). Belə guman olunur ki, bu qalıqlar zülalın daxilində hüceyrə daxilinə baxan və hüceyrə xaricinə baxan qlükoza birləşdirən mərkəzləri əmələ gətirirlər (bax Şəkil 11-5).

Bütün GLUT izoformaların quruluşları, guman olunur ki, kifayət qədər oxşardır və bütün bunların hamısı şəkərləri daşıyırlar. Bununla belə, müxtəlif hüceyrə tiplərində onların differensial ekspressiyası, hüceyrə səthində GLUT daşıyıcıların sayının nizamlanması və izoforma spesifik fəaliyyət xüsusiyyətləri müxtəlif bədən hüceyrələrinin qlükoza metabolizminin müxtəlif cürə nizamlamasını mümkün edir, eyni zamanda, qanda qlükozanın sabit qatılığının saxlanılmasına imkan verir. Məsələn, GLUT3 beyinin neyron hüceyrələrində tapılmışdır. Neyronlar, metabolizm üçün qlükozanın sabit şəkildə udulmasından asılıdırlar və GLUT3-ün aşağı K_m qiyməti qlükoza üçün (K_m = 1.5 mM) GLUT1-inki ilə eynidir, bu beyinin hüceyrəxarici mayesindən qlükozanın hüceyrələrə sabit şəkildə yüksək dərəcədə daxil olunmasını təmin edir.

Qaraciyər hüceyrələrində və mədəaltə vəzin insulin-ifraz edən β adacıq hüceyrələrində ekspressiya olunam GLUT2 ~20 mM K_m qiymətinə malikdir, bu GLUT1-in K_m qiymətindən 13 dəfə yüksəkdir. Nəticədə, qidalanmadan sonra, qanda qlükoza 5 mM bazal səviyyəsindən 10 mM və ya daha artıq səviyyəyə qalxdıqda qlükozanın udulması sürəti GLUT2-ekspressiya olunan hüceyrələrdə demək olar ki, iki dəfə artdığı halda GLUT1-ekspressiya olunan hüceyrələrdə yüngülcə artaır (bax Şəkil 11-4). Qaraciyərdə hüceyrə daxilinə götürülən qlükozanın "artıq miqdarı" polimer qlikogen kimi saxlanılır. Qlükozanın adacıq β hüceyrələrdə artması insulin hormonunun ifraz olunmasına səbəb olur (bax Şəkil 16-39), o isə öz növbəsində, qlükozanın sorulmasını və əzələlərdə onun metabolizmini gücləndirməklə və qaraciyərdə qlükoza istehsalını ingibirləşdirməklə qanda qlükozanın səviyyəsin aşağı salır (bax Şəkil 15-37). Həqiqətən də, GLUT2-nin mədəaltı β hüceyrələrdə hüceyrə-spesifik fəalsızlaşması qlükoza ilə stimullaşan insulin ifrazına mane olur və qaraciyər hüceyrələrində (hepatositlərdə) qlükozaya-həssas genlərin ekspressiyasının tənzimlənməsini pozur.

Başqa bir GLUT izoforması, qlükozanın soruılmasını artırmaqla insulinə cavab verən GLUT4 yalnız piy və əzələ hüceyrələrində ekspressiya olunur və beləliklə qlükozanı qandan çıxarır. İnsulin çatmayanda, GLUT4, plazma membranında deyil hüceyrədaxili membranlarda məskunlaşır, ona görə də hüceyrəxarici mayedən qlükozanı götürmək qabliyyətinə malik olmur. Detalları Şəkil 16-40-da göstərilmiş proseslərə görə insulin GLUT4-lə zəngin olan daxili membranların plazma membranı ilə qovşaq əmələ gətirməsinə və beləliklə də, hüceyrə səthində GLUT4 molekullarının sayının artmasına səbəb olur və nəticədə qlükozanın sorulması sürəti artır. Bu, insulinin qanda qlükozanın səviyyəsini aşağı saldığı əsas mexanizmlərdən biridir, GLUT4-ün plazma membranına keçməsində olan qüsurlar qocalığın başlanmasının və ya qlükozanın uzunsürən və davamlı şəkildə qanda yüksək miqdarının göstərildiyi II tip diabetin yaranmasının səbəblərdən biridir.

GLUT5 fruktozaya yüksək spesifikliyi olan yeganə GLUT zülalıdır, onun əsas ekspressiya saytı bağırsaq epiteli hüceyrələrində apikal membrandır, burada o qida fruktozazsının bağırsaq lümenlərindən hüceyrə daxilinə daşınmasını həyata keçirir.

Nəqliyyat Zülalları Süni Membranlardan və Rekombinant Hüceyrələrdən İstifadə Etməklə Öyrənilə bilər

Nəqliyyat zülallarının və V_{max} və K_m parametrlərinin və birləşmək üçün cavabdeh olan əsas qalıqlarının təyini təyin edilməsi kimi daxili xüsusiyyətlərini öyrənmək üçün müxtəlif yanaşmalar mövcuddur. Əksər hüceyrə membranları çoxsaylı müxtəlif tipli nəqliyyat zülallarına malik olurlar, amma onların istənilən hər biri nisbətən aşağı qatılıqda olur, bu da vahid bir zülalın funksional tədqiqini çətinləşdirir. Bu cürə tədqiqatları asanlaşdırmaq üçün tədqiqatçılar maraq daxilində olan nəqliyyat zülalını zənginləşdirmək məqsədi ilə, onun membranda üstünlük (dominantlıq) təşkil etməsi üçün iki yanaşmadan istifadə edirlər: buirinci, həmin zülalın təmizlənməsi və süni membrana yerləşdirilməsi, ikinci rekombinant hüceyrələrdə superekspressiyası.

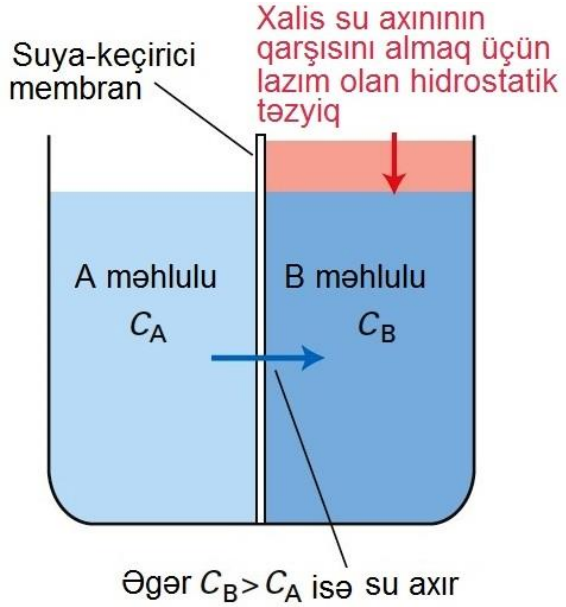
Birinci yanaşmada, spesifik nəqliyyat zülalı detergent vasitəsi ilə öz membranından ayrılır və təmizlənir. Nəqliyyat zülalları membranlardan ayrıla və təmizlənə bilsələr də, onların funksional xassələri (belə ki, substratın membrandan kəsib keçərək daşınması) yalnız membranla assosasiyada olduqları halda öyrənilə bilər. Beləliklə, təmizlənmiş zülal adətən yenidən təmiz fosfolipid ikiqatlısından ibarət olan membrana, məsələn, membrandan keçən substratın daşınmasının asanlıqla ölçülməsi mümkün olan liposomlara birləşdirilir (bax Şəkil 7-3). GLUT1 üçün belə yaxşı mənbələrdən biri eritrosit membranlarıdır. Digəri GLUT1 transgenini ekspressiya edən, məməlilərin rekombinant kultura olunan hüceyrəsidir, çox hallarda onun N- və ya C-sonluğuna qovşaq olunmuş epitop yarlıklı [molekulun monoklonal anticismlə birləşə bilən (bax Fəsil 9) hissəsi] modifikasiya olunmuş GLUT1-i ekspressiya edilir. Bu iki tip hüceyrənin istənilən birində bütün inteqral zülallar ionlaşmayan detergentlə, məsələn, membran zülallarını əhəmiyyətli dərəcədə zədələmədən membranları həll edilə bilən oktilqlikozidlə ekstraksiya oluna bilir. GLUT1 qlükoza yuniporteri həll olunmuş qatışıqdan ya GLUT1-spesifik monoklonal anticismə, ya da epitop yarlık üçün spesifik olan anticismə malik olan kalonkadan istifadə edərək anticism-affin xromotoqrafiyası yolu ilə (Fəsil 3) təmizlənə bilər və sonra təmiz fosfolipidlərdən hazırlanmış liposomlara birləşdirilə bilər.

Alternativ olaraq, spesifik nəqliyyat zülalını kodlaşdıran gen, normal halda bu geni ekspressiya etməyən hüceyrə tipində yüksək səviyyədə ekspressiya oluna bilər. Maddələrin transfeksiya olunmuş hüceyrələrdə və transfeksiya olunmamış nəzarət hüceyrələrində daşınmasındakı fərq ekspressiya olunmuş nəqliyyat zülalının nəticəsidir. Bu sistemlərdə, müxtəlif membran zülallarının funksional xassəsi, ayırılma və

təmizləmə prosesi zamanı, məsələn, zülalın qismən denaturasiyası nəticəsində yaranan heç bir qeyri-müəyyənlilik olmadan yoxlanıla bilər. Buna nümunə olarq, kultura olunan fibroblast hüceyrə xətlərində GLUT1-in superekspressiyası onların qlükoza udmaq sürətini bir neçə dəfə artıra bilir və xüsusi amin turşularının dəyişilməsi ilə alınan mutant GLUT1 zülallarının ekspressiyası substrat birləşməsi üçün əhəmiyyətli olan qalıqların tapılmasına imkan verə bilər.

Osmotik Təzyiq Suyun Membrandan Keçərək Hərəkətinə Səbəb Olur

Suyun hüceyrə daxilinə və xaricinə hərəkəti bütün orqanizmlərin həyatında çox əhəmiyyətli xüsusiyyətdir. Akvaporinlər membran zülalları ailəsi olub suyun və qliserin kimi bir sıra başqa kiçik yüksüz molekulların biomembranları səmərəli şəkildə kəsib keçməsinə imkan verir. Amma bu nəqliyyat zülallarını müzakirə etməzdən öncə bizə suyun membrandan keçib getməsini təmin edən qüvvəyə, osmosa (osmozisə) baxmaq lazımdır.



ŞƏKİL 11-6 Osmotik təzyiq. A və B məhlulları süya keçirici olan, amma qalan bütün məhlullara keçirici olmayan membranla ayrılmışdır. Əgər, C_B (B məhlülündə maddələrin ümumi qatılığı) C_A-dan böyükdürsə su membrandan keçərək A-dan B-ə axacaq. Osmotik təzyiq π bu su axınına mane olmaq üçün B məhluluna tətbiq olunan hidrostatik təzyiqdir. van′t Hoff tənliyindən osmotik təzyiq $\pi = RT(C_B - C_A)$ ilə verilir, burada R qaz sabitidir, T mütləq temperaturdır.

Su yarımkeçirici membranda spontan şəkildə aşağı qatılıqlı məhluldan (daha yuxarı su qatılığı) "aşağıya" doğru yuxarı qatılıqlı məhlula (daha aşağı su qatılığı olan məhlul) doğru hərəkət edir, bu prosesə **osmozis** və ya *osmotik axın* deyilir. Həqiqətdə, osmozis suyun yarımkeçirici membrandan "diffuziyasına" ekvivalentdir. *Osmotik təzyi*q, xalis suyun müxtəlif su qatılıqlarına malik olan məhlulları ayıran membrandan keçərək axmasını dayandırmaq üçün tələb olunan hidrostatik təzyiq kimi təyin edilir (Şəkil 11-6). Başqa sözlə, osmotik təzyiq su qatılığı qradientinin entropiya ilə idarə olunan termodinamik gücünü tarazlayır. Bu kontekstdə, "membran" suya keçirici olan, amma onun tərkibində həll olan maddələrə keçirici olmayan hüceyrələr qatı və ya plazma membranı ola bilər. Osmotik təzyiq, membranın iki tərəfində məhlul molekullarının ümumi sayının qatılıqlarının fərqinə birbaşa mütənasibdir. Məsələn, 0.5 M NaCl məhlulu əslində 0.5 M Na^+ və 0.5 M Cl^- ionlarından təşkil olunub və 1 M qlükoza və ya saxaroza məhlulları kimi eyni osmotik təzyiqə malikdir.

Suyun plazma membranından keçərək hərəkəti fərdi hüceyrənin həcmini müəyyən edir və hüceyrəni zədələməmək üçün tənzimlənməlidir. Hüceyrəxarici osmotik şəraitlərdə kiçik dəyişiklik əksər heyvan hüceyrələrinin tez şəkildə şişməsinə və yığılmasına səbəb olur. **Hipotonik** məhlula (yəni, məhlulların qatılığı sitozolun qatılığından *aşağı* olan qatılıq) yerləşdirərkən heyvan hüceyrələri suyun daxilə osmotik axması nəticəsində şişir. Əksinə, **hipertonik** məhlula yerləşdirəndə (yəni məhlulun qatılığı sitozolun qatılığından *yuxarı* olanda) heyvan hüceyrələri daxildəki suyun xaricə osmotik axması nəticəsində kiçilir. Nəticə etibarı ilə, kultura olunan heyvan hüceyrələri, məhlulun qatılığı və uyğun olaraq onun osmotik gücü hüceyrə sitozolununkına bərabər olan **izotonik** mühitdə saxlanılmalıdır.

Borulu (vazikulyar) bitklərdə su və minerallar torpaqdan köklərlə sorulur və keçirici borularla (ksilema ilə) yuxarıya bitkiyə daşınır, bitkidən suyun itirilməsi, əsasən də suyun yarpaqlarla buxarlandırılması suyun yuxarıya hərəkətini idarə edir. Heyvan hüceyrələrindən fərqli olaraq, bitki, yosun, göbələk və bakterial hüceyrələr sərt hüceyrə divarı ilə əhatə olunmuşlar, bu da, hüceyrədaxili osmotik təzyiq artarkən hüceyrənin həcminin genişlənməsinə qarşı müqavimət göstərir. Belə hüceyrə divarı olmayan heyvan hüceyrələri daxili osmotik təzyiq artarkən genişlənir, əgər belə təzyiq həddən artıq qalxarsa hüceyrələr həddən artıq üfürülmüş şar kimi partlayacaq. Bitkilərdə hüceyrə divarına görə, belə heceyrələr hipotonuk məhlula (hətta təmiz suya) yerləşdirilərkən meydana gələn suyun osmotik axını hüceyrə həcminin deyil, hüceyrədaxili təzyiqin artmasına səbəb olur.

Bitki hüceyrələrində məhlulların qatılığı (məsələn, şəkərlərin, və duzların) adətən sitozola nisbətən vakuolda yüksək olur (bax Şəkil 1-12a), sitozol isə öz növbəsində hüceyrəxarici mühitə nisbətən məhlulların daha yüksək qatılığına malik olur. Suyun sitozola daxil olması ilə, sonra da vakuola daxil olması ilə əmələ gələn *turqor təzyiqi* adlanan osmotik təzyiq sitozolu və plazma membranını dözümlü sərt hüceyrə divarına qarşı basır. Bitki hüceyrələri bu təzyiqi cilovlayaraq ondan dik durmaq və böyümək üçün istifadə edirlər. Böyümə (inkişaf) zamanı hüceyrənin uzunaması (elonqasiyası) müəyyən rayonlarda hüceyrə divarının hormonla-induksiya olunan lokal boşalması və bunun dalınca da suyun vakuola axması, onun ölçüsünün böyüməsi və beləliklə də hüceyrənin ölçüsünün böyüməsi baş verir.

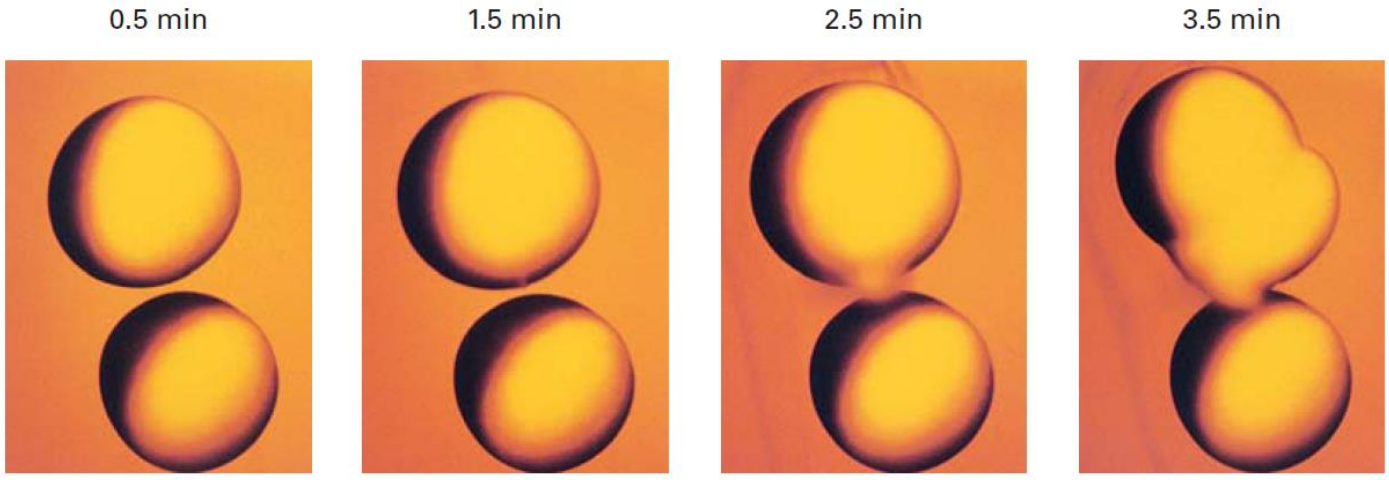
Hərçənd ki, ibtidailərin (protozoanların) əksəriyyəti (heyvan hüceyrələri kimi) sərt hüceyrə divarına malik deyillər, amma onların əksəriyyəti yığıla (kiçilə) bilən vakuola malikdirlər, bu da onlara osmotik lizisdən (dağılmaqdan) yayınmağa kömək edir. Yığıla bilən vakuol sitozoldan suyu götürür və sonra bitki vakuolundan fərqli olaraq dövrü olaraq plazma membranı ilə qovuşaraq öz tərkibini boşaldır. Beləliklə

baxmayaraq ki, su fasiləsiz şəkildə osmotik axınla ibtidailərin hüceyrəsinə daxil olur, yığıla bilən vakuol hüceyrədə həddən artıq suyun toplanmasına və onun partlama nöqtəsinə qədər şişməsinə mane olur.

Akvaporinlər Hüceyrə Membranının Su Keçiriciliyini Artırır

Osmotik təztiq nəticəsində suyun hüceyrə membranından keçərək axmasına olan təbii meyillilik bariz bir sualı ortaya çıxarır: nəyə görə şirin-su heyvanlarının hüceyrələri suda partlamırlar? Məsələn, qurbağalar öz yumurtalarını hovuz sularına qoyurlar (hipotonik məhlul), amma qurbağaların oositləri və yumurtaları su ilə şişmirlər, baxmayaraq ki, onların daxili duz (əsasən KCl) qatılığı başqa hüceyrələrinkinə bərabərdir (~150 mM KCl). Bu müşahidələr ilk dəfə tədqiqatçılara əksər hüceyrə tiplərinin plazma membranında suyun osmotik axınını sürətləndirən su kanalları zülallarına malik olması, amma qurbağa oositinin malik olmaması barədə şübhələnmələrinə səbəb olmuşdur. Şəkil 11-7-də verilən eksperimental nəticələr göstərir ki, eritrosit plazma membranından alınan akvaporin su kanalı kimi fəaliyyət göstərir.

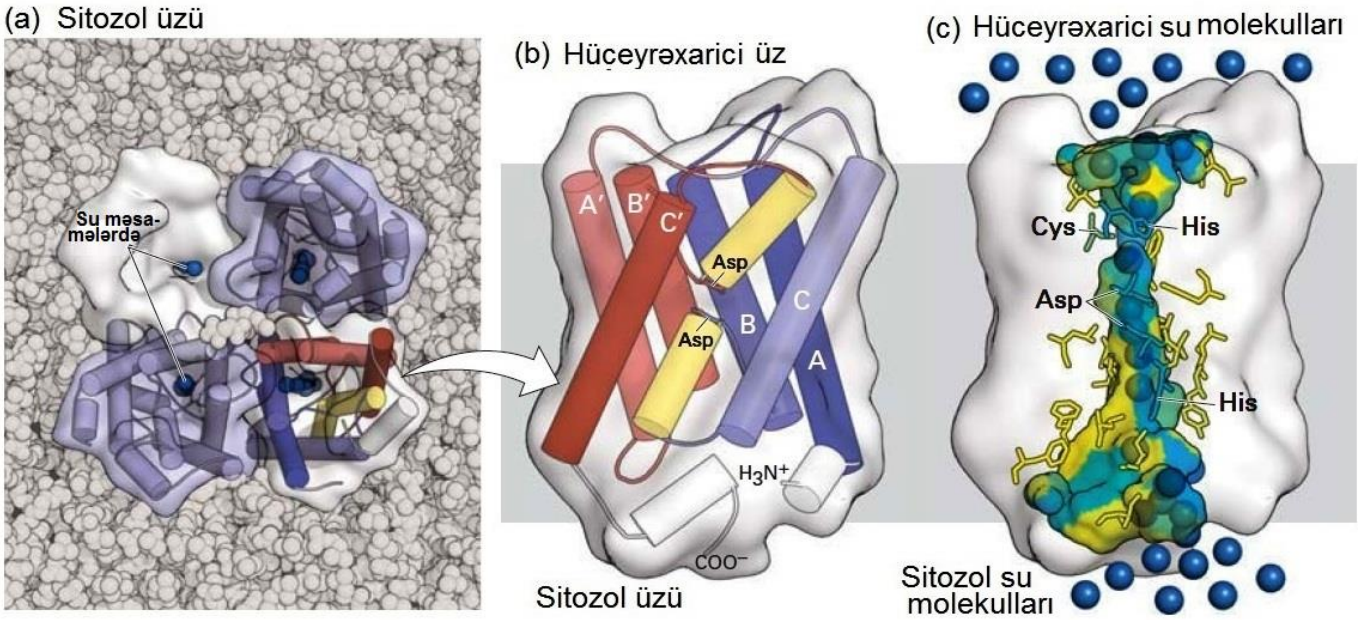
Akvaporin özünün funksional formasında dörd identik 28 kDa subvahidlərin tetrameridir (Şəkil 11-8a). Hər bir subvahid qatılıq qradientindən asılı olaraq suyum hər iki istiqamətdə hərəkət edə biləcəyi mərkəzi məsaməni əmələ gətirən altı transmembran α spirala malikdirlər (Şəkil 11-8b, c). Hər monomerin ortasındakı ~2 nm uzunluqda suya-selektiv dar kanal və ya məsamə yalnız 0.28 nm diametrdədir, bu, su molekulunun diametrindən azaca böyükdür. Daralmanın molekulyar ələk xassəsi, yan zəncirləri və karbonil qrupları kanalın ortasına tərəf uzanan bir neçə konservativ hidrofil amin turşusu qalıqları ilə və kanalın bir tərəfində uzanan nisbətən hidrofob olan divarla müəyyən olunur. Bir neçə su molekulu kanalla eyni zamanda hərəkət edir, hər bir molekul ardıcıl olaraq kanalın daxili qatının amin turşu qalıqları ilə spesifik hidrogen rabitələri əmələ gətirərək başqa su molekulunun yerini aşağıya doğru dəyişir. Akvaporinlər suyun daşınması zamanı konformasiya dəyişikliyinə uğramadıqlarından onlar suyu qlükoza daşıyıcıları GLUT1-dən bir neçə dəfə sürətlə daşıyırlar. Suyun oksigen atomları ilə iki amin turşusunn yan zəncirlərinin amin qrupları arasında hidrogen əlaqələrinin formalaşması, yalnız yüksüz suyun (H_3O^- deyil, məhz H_2O) kanaldan keçməsinə imkan verir, kanalda su molekullarının istiqaməti protonların birindən digərinə tullanmasına mane olur və bununla protonların kanalda xalis hərəkətinə mane olur. Nəticədə, hətta su akvaporinlər vasitəsi ilə membranı keçərək axsa da membran tərəflərində ion qradientləri saxlanılır.



EKSPERIMENTAL ŞƏKIL 11-7 Qurbağanın oositində akvaporinlərin ekspressiyası onların su keçiriciliyini artırır. Normal halda suya keçirici olmayan və akvaporin zülallarını ekspressiya etməyən qurbağaların oositinə akvaporini kodlaşdıran mRNT mikropinyeksiya olundu. Bu fotoqrafiyalar nəzarət oositlərini (hər bir paneldə aşağıdakı hüceyrələr) və mikroinyeksiya olunmuş oositləri (hər bir paneldə yuxarı hüceyrələr), izotonik duz məhlulundan (0.1 M) hipotoniik duz məhluluna (0.035 M) keçirildikdən sonra qeyd olunmuş zamanda göstərir. Nəzarət oositlərinin həcimi dəyişilməmiş qalımışdır, çünki onlar suya çox pis keçiricidirlər. Əksinə, akvaporini ekspressiya edən mikroinyeksiya olunmuş hüceyrələr şişirlər və sonra suyun osmotik axını nəticəsində partlayırlar, bu göstərir ki, akvaporinlər su-kanalları zülallarıdırlar. Bax L.S. King, D. Kozono and P. Agre, 2004, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **5**:687-698. [Nəzakətlə, Gregori M.Preston and Peter Agre tərəfindən.]

Məməlilər akvaporinlər ailəsini ekspressiya edirlər, insanlarda 11 belə gen məlumdur. Akvaporin 1 eritrositlərdə zəngin şəkildə ekspressiya olunur və onun homoloqu akvaporin 2 böyrəyin sidikdən suyu soran və bədəndə suyun miqdarına nəzarət edən epiteli hüceyrələrində tapılıb. Akvaporin 2-nin fəaliyyəti vasopressinlə tənzimlənir, buna həmçinin antidiuretik hormon da deyilir. Sakitçilik dövründə olan böyrək hüceyrələrində akvaporin 2-nin fəallığının tənzimlənməsi piy və əzələ hüceyrələrində sakitlik vəziyyətində GLUT4-ün fəallığının tələb olunmadığı zaman tənzimlənməni xatırladır, hüceyrələr sakitlik vəziyyətində olanda və sidik əmələ gətirmək

üçün su çıxarılanda, akvaporin 2 hüceyrədaxili qovucuq membranlarında izolyasiya olunur, ona görə də suyun hüceyrə daxilinə daşınmasını həyata keçirə bilmir. Poliopeptid hormon vazopresin hüceyrə səthində vazopresin reseptor zülalına birləşəndə o, hüceyrədaxili siqnal kimi cAMP-dən istifadə edərək siqnal yolunu fəallaşdırır (ətraflı Fəsil 15-də) cAMP akvaporin-2-yə malik olan qovucuqların plazma membranı ilə qovuşmasına səbəb olur, suyun daxilə sorulmasının və onun sidiyə deyil dövrəyə qayıtmasının sürətini artırır. İstər vazopressin reseptor istərsə də akvaporin 2 genində fəalsızlaşdırıcı mutasiyalar *şəkərsiz diabetin* (*diabetes insipidus*), böyük həcimdə duruldulmuş sidiyin ifraz olunması ilə xarakterik olan xəstəlityin yaranmasına səbəb olur. Bu araşdırma göstərir ki, akvaporin 2-nin səviyyəsi suyun böyrəklər tərəfindən yaradılan sidikdən yenidən sorulması dərəcəsini məhdudlaşdırır.



ŞƏKİL 11-8 Akvaporinlərin quruluşu. (a) Dörd identik subvahiddən təşkil olunan tetramer zülalın quruluş modeli. Eqzoplazmatik tərəfdən aşağıya, zülala baxdıqda bu görünüşdən göründüyü kimi, hər bir subvahid su kanalını əmələ gətirir. Göstərilən monomerlərdən birinin molekulyar səthində məsamənin girişi görünür. (b) Tək bir akvaporin subvahidinin membranla əlaqədar topologiyasının sxematik diaqramı. Üç cüt homoloji transmembran α spiral (A və A′, B və B′, C və C′) membranla nisbətdə əks istiqamətlərdə yönəlmişlər və membrana-sarınmayan qısa spirala malik və konservativ asparagin (N) qalığına malik olan iki hidrofob ilgəklə birləşmişlər. İlgəklər altı transmembran spiralla əmələ gəlmiş böşluğa əyilir və ortada birləşərək su-seçim qapısını (girişini) əmələ gətirirlər. (c) Yalnız bir akvaporində məsamənin yandan görünüşü, bir neçə su molekulu (mavi kürələr) su ilə dolu sitozolu və hüceyrəxarici dəhlizi birbirindən ayıran 2-nm-uzunluqda su-seçim qapısında görünürlər. Qapı yan zəncirləri daşınan su molekulları ilə hidrogen əlaqələrini əmələ gətirən yüksək dərəcədə konservativ olan amin turşusu qalıqlarına malikdir. Məsaməni daxildən örtən amin turşuları hidrofildən (mavi) hidrofoba (sarı) doğru rənglənmişdir. Daşınan su molekulları sistein qalığının əsas-zəncirinin karbonil qrupu ilə də hidrogen əlaqələrini əmələ gətirirlər. Bu hidrogen əlaqələrinin düzülüşü və məsamə diametrinin 0.28 nm darlıqda olması protonların (H_3O^+) və ya başqa ionların keçməsinə mane olur. Bax T. Zeuthen, 2001, *Trends Trends Biochem. Sci*. **26**:77, və K.Murata et al., 2000, *Nature* **407**:599. [Verilənlər Su et al., 2001, *Nature* **414**:872, PDB ID 1j4n.]

Akvaporinlər ailəsinin başqa nümayəndələri suyu deyil, qliserin kimi hdroksil qrupuna malik olan molekulları daşıyırlar. Məsələn, insanın akvaporin 3-ü qliserini daşıyır və aminturşu ardıcıllığına görə və quruluşuna görə *Escherichia coli*-nin qliserin nəqliyyat zülalı GlpF-ə oxşayır.

11.2 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Qlükoza və Suyun Asanlaşdırılmış Nəqliyyatı

- Bioloji məhlulların membrandan keçərək zülalla-kataliz olunan daşınması sadə diffuziyaya nisbətən daha sürətlə baş verir, məhdud sayda daşıyıcı molekullar substratla doyduqda V_{max} nümayiş etdirirlər və substrata yüksək dərəcədə spesifikdirlər (bax Şəkil 11-4).
- Guman olunur ki, glükoza daşıyıcıları (GLUT-lar) kimi yuniport zülallar, iki konformasiya vəziyyəti arasında dəyişilir, bunların birində substrat-birləşdirən məkəz hüceyrə xaricinə baxır, digərində isə substrat-birləşdirən məkəz hüceyrə daxilinə baxır (bax Şəkil 11-5).
- GLUT zülallar ailəsinin bütün nümayəndələri şəkərləri daşıyırlar və oxşar quruluşa malikdirlər. Onların K_m qiymətlərindəki fərqlər, müxtəlif hüceyrə tiplərində ekspressiya olunmaları və substrat spesifikliyi bədəndə şəkərin düzgün metabolizmi üçün əhəmiyyətlidir.

- Nəqliyyat zülallarının fəaliyyətini öyrənmək üçün iki ümumi eksperimental sistem, təmizlənmiş nəqliyyat zülalına malik olan liposomlar və xüsusi nəqliyyat zülalını kodlaşdıran genin keçirildiyi (transfeksiya olunduğu) hüceyrələrdir.
- Bioloji membranların əksəriyyəti yarımkeçiricidir, ionlara və ya başqa məhlullara nisbətən suya daha keçiricidirlər. Su membrandan osmosla aşağı qatılıqlı məhluldan yüksək qatılıqlı məhlüla doğru keçir.
- Bitki hüceyrələrini əhatə edən sərt hüceyrə divarı hüceyrələrin şişməsinin qarşısını alır və suyun osmotik udulmasına cavab olaraq turqor təzyiqinin yaranmasına səbəb olur.
- Akvaporinlər biomembranların su keçiriciliyini xüsusi olaraq artıran su-kanalları zülallarıdırlar (bax Şəkil 11-8).
- Akvaporin 2, müəyyən böyrək hüceyrələrinin plazma membranında əmələ gələn sidikdən suyun sorulması üçün vacibdir, akvaporin 2-nin olmaması qeyri şəkər diabeti (diabetes insipidus) xəstəlik vəziyyətini yaradır.

11.3 ATP ilə İşləyən Nasoslar və Hüceyrədaxili İon Mühiti

Əvvəlki bölmələrdə biz diqqətimizi, molekulları onların qatılıq qradientinin azalan istiqamətində daşıyan nəqliyyat zülallarına (asanlaşdırılan nəqliyyat) cəmləmişdik. Biz burada diqqətimizi zülalların əsas sinifinə – ATP-nin sonuncu (terminal) fosfoanhidrid əlaqəsinin hidrolizindən ayrılan enerjini ionların və müxtəlif kiçik molekulların membrandan keçərək *qatılıq qradientlərinin əksinə* daşınmasında istifadə edən ATP ilə-işləyən nasoslara cəmləyəcəyik. Bütün ATP ilə-işləyən nasoslar həmişə sitozola baxan subvahidində və ya seqmqntində bir və ya daha artıq ATP birləşdirən sayta malik olan transmembran zülallardırlar. Ümumilikdə bu zalallara ATP-azalar deyirlər, amma onlar normal halda, ionların və ya başqa molekulların birgə daşınması olmadığı halda ATP-ni ADP-yə və Pi hidroliz etmirlər. ATP hidrolizi və nəqliyyat bir-biri ilə six *bağlı* olduğundan, fosfoanhidrid əlaqəsində saxlanılan enerji istilik kimi ətrafa buraxilmir, əksinə ionları və ya başqa molekulları yuxarıya, elektrokimyəvi qradientin əksinə daşınmasında istifadə edilir.

ATP ilə-İşləyən Nasosların Dörd Əsas Sinifi Var

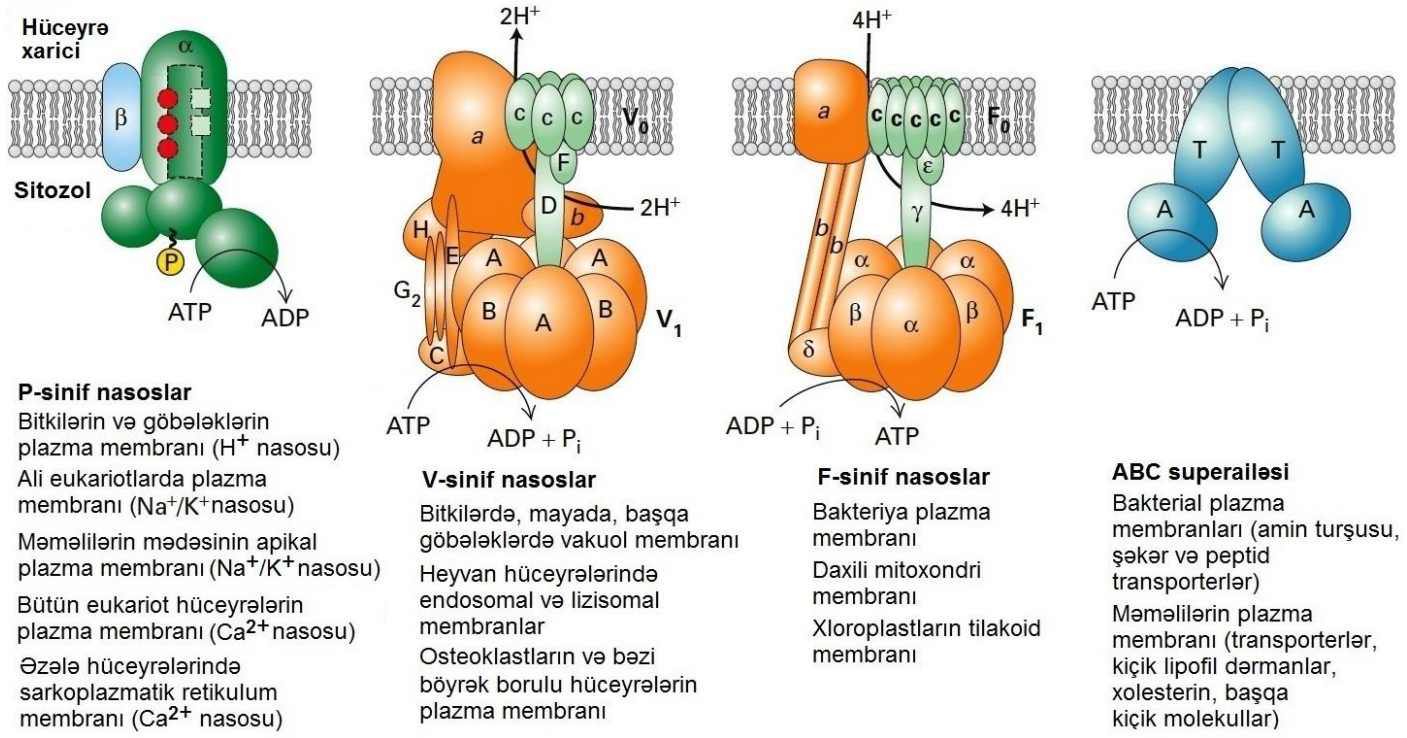
ATP-ilə-işləyən nasosların dörd əsas sinifinin ümumi quruluşları Şəkil 11-9-da, hər bir sinifin xüsusi nümunələri şəkilin altında verilməklə birlikdə göstərilmişdir. Qeyd edək ki, bu siniflərin üçünün (P, F və V) nümayəndələri yalnız ionları daşıyırlar, həmçinin dördüncü sinifin, ABC superailəsinin bəzi nümayəndələri də ionları daşıyırlar. ABC superailəsinin əksər nümayəndələri kiçik molekulları, o cumlədən amin turşularını, şəkərləri, peptidləri, lipidləri və başqa kiçik molekulları, məsələn çox sayda müxtəlif dərmanları daşıyırlar.

Bütün *P-sinif ion nasosalrı* iki identik α subvahidə malikdir və bunların da hər biri ATP-birləşdirən sayta malikdir. Onların əksəriyyəti, həmçinin tənzimləyici funksiyanı yerinə yetirən iki kiçik β subvahidə malikdir. Daşınma zamanı, ən azı α subvahidlərin biri fosforlaşmış olur (buradan da "P" sinif adlanır) və daşınan ionlar fosforlaşmış subvahiddən keçərək hərəkət edirlər. Fosforlaşmış qalıqlar ətrafındakı amin turşusu ardıcıllıqları müxtəlif nasoslarda homologiya təşkil edirlər. Bu sinifə, heyvan hüceyrələri üçün tipik olan, aşağı sitozol Na^+ qatılığını və yuxarı sitozol K^+ qatılığını yaradan plazma membranındakı Na^+/K^+ ATP-aza daxildir (bax Şəkil 11-3). Bəzi Ca^{2+} ATP-azalar Ca^{2+} ionlarını sitozoldan kənara, hüceyrə xaricindəki mühitə vurur, başqaları Ca^{2+} ionlarını sitozoldan endoplazmatik şəbəkəyə və ya əzələ hüceyrələrində tapılmış **sarkoplazmatik şəbəkə** adlanan xüsusi ER-a vurur. P sinifin məməlilərin mədəsində turşu ifraz edən hüceyrələrdə tapılmış başqa br nümayəndəsi protonları (H^+ ionları) hüceyrədən kənara və K^+ ionlarını hüceyrəyə daşıyır.

V-sinif və *F-sinif ion nasoslarını*n quruluşu bir birinə oxşardır amma onlar qohum (yaxın) deyillər və P-sinif nasoslardan daha çox mürəkkəbdirlər. V- və F-sinif nasoslar bir sıra müxtəlif transmembran və sitozol subvahidlərinə malikdirlər. Virtual olaraq bütün məlum olan V və F nasoslar yalnız protonları daşıyırlar və fosfozülal aralıq məhsulları daxil olmayan proseslərdə də belə edirlər. V-sinif nasoslar əsasən aşağı pH yaratmaq üçün bitki vakuolları və lizosomlarında, həmçinin heyvan hüceyrələrinin başqa turş qovucuqlarında protonları membranın situzol üzündən eqzoplazmaik üzünə proton elektrokimyəvi qradientin əksinə vurmaqla fəaliyyət göstərirlər. Əksinə, bitkilərdə, göbələklərdə və çoxsaylı bakterial hüceyrələrdə plazma-membranının elektrik potensialını yaradan və onu saxlayan proton nasosları P-sinif proton nasoslarına aiddirlər.

F-sinif nasoslar bakterial plazma membranında, hmçinin mitoxondri və xloroplastlarda tapılmışlar. V-sinif nasosların əksinə, F-sinif nasoslar əsasən geriyə proton nasosları kimi fəaliyyət göstərirlər, protonların membranın eqzoplazmatik üzündən sitozol üzünə elektrokimyəvi qradientlə *aşağıya* doğru, energetik cəhətdən əlverişli olan hərəkətindən ayrılan enerjini energetik cəhətdən əlverişsiz olan reaksiyaya, ADP və Pi-dən ATP-nin sintezinə sərf edirlər. Xloroplast və mitoxondrilərdə, ATP sintezində əhəmiyyətinə görə, ümimilikdə ATP-sintazalar adlanan F-sinif proton nasoslarına Fəsil 12-də (Hüceyrə Energetikası) ayrılıqda baxılır.

ATP-ilə işləyən nasosların son sinifi çoxsaylı üzvlərə malik olan böyük ailədir və fəaliyyətinə görə başqa siniflərin üzvlərinə nisbətən daha çox müxtəlifdir. **ABC superailəsi** (**ATP – birləşdirən kaset**) hesab edilən bu sinifə, bakterialardan insana qədər müxtəlif orqanizmlərdə tapılmış bir-neçə yüz müxtəlif nəqliyyat zülalları daxildirlər. Aşağıda ətraflı verildiyi kimi, bu nəqliyyat zülallarından bəziləri, ilk dəfə **çoxsaylı-dərmana-dözümlülük** zülalları (**multidrag-resistance** proteins) kimi identifikasiya olunmuşlar və xərçəng hüceyrələrində superekspressiya olunarkən xərçəngə qarşə dərmanları hüceyrədən kənara çıxarır və şişdə dərmana qarşı dözümlülük yaradır. Hər bir ABC zülal bir substrata və ya qohum substratlar qrupuna spesifik olur, bunlar ionlar, şəkərlər, amin turşuları, fosfolipidlər, xolesterin, peptidlər, polisaxaridlər və hətta zülallar ola bilərlər. Bütün ABC nəqliyyat zülalları quruluş təşkilini bölüşürlər (oxşardırlar), dörd "özək" domendən təşkil olunmuşlar: molekulların membranı keçərək daşındığı keçid-yolunu əmələ gətirən iki transmembran (T) domen və iki ATP- birləşdirən (A) sitozol domenləri. Bəzi ABC zülallarında



P-sinif nasoslar

Bitkilərin və göbələklərin plazma membranı (H^+ nasosu)

Ali eukariotlarda plazma membranı (Na^+/K^+nasosu)

Məməlilərin mədəsinin apikal plazma membranı (Na^+/K^+nasosu)

Bütün eukariot hüceyrələrin plazma membranı (Ca^{2+}nasosu)

Əzələ hüceyrələrində sarkoplazmatik retikulum membranı (Ca^{2+} nasosu)

V-sinif nasoslar

Bitkilərdə, mayada, başqa göbələklərdə vakuol membranı

Heyvan hüceyrələrində endosomal və lizisomal membranlar

Osteoklastların və bəzi böyrək borulu hüceyrələrin plazma membranı

F-sinif nasoslar

Bakteriya plazma membranı

Daxili mitoxondri membranı

Xloroplastların tilakoid membranı

ABC superailəsi

Bakterial plazma membranları (amin turşusu, şəkər və peptid transporterlər)

Məməlilərin plazma membranı (transporterlər, kiçik lipofil dərmanlar, xolesterin, başqa kiçik molekullar)

ŞƏKİL 11-9 ATP ilə-işləyən nəqliyyat zülallarının dörd sinifi. Spesifik nasosların yerləşməsi hər bir sinifin altında göstərilmişdir. P-sinifi nasosları, daşınma tsiklinin bir hissəsi kimi fosforlaşan iki katalitik α subvahiddən təşkil olunmuşdur. Bu nasosların bəzilərində mövcud olan iki β subvahid daşınmanı tənzimləyə bilir. Burada yalnız bir α və bir β sibvahid göstərilmişdir. V-sinif və F-sinif nasosları fosfozülal aralıq məhsulu əmələ gətirmirlər və demək olar ki, hamısı yalnız protonları daşıyırlar. Onların quruluşu oxşardır və oxşar zülallara malikdirlər, amma onların heç bir subvahidi P-sinif nasoslarının subvahidlərinə oxşmır. V sinif nasosları ATP hidrolizini protonların qatılıq qradientinin əksinə daşınması ilə birləşdirir, halbuki F sinif nasoslar normal halda geriyə istiqamətdə fəaliyyət göstərərək, proton qatılığındakı və ya gərginlik qradientindəki enerjini ATP sintez etmək üçün sərf edir. Böyük ABC superailəsi zülallarının bütün nümayəndələri iki transmembran (T) domenə və məhlulun daşınması ilə ATP hidrolizini bağlayan iki sitozol ATP-birləşdirən (A) domenlərə malikdirlər. Bu əsas domenlər bəzi ABS zülallarda ayrıca subvahidlər kimi mövcuddurlar (burada göstərildiyi kimi), amma başqa ABS zülallarda yalnız bir polipeptiddə qovuşaq olunmuşlar. Bax T.Nishi and M. Forgac, 2002, *Nature Ref.Mol.Cell Biol*. **3**:94; C. Toyoshima et al., 2000, *Nature* **405**:647; D. Mcintosh, *Nature Struc. Biol* **7**:532; və T. Elston, H. Wang and G. Oster, 1998, *Nature* **391**:510.

xüsusən də bakteriyalarda olanlarda özək domenləri dörd ayrıca polipeptiddən təşkil olunmuşlar, digərlərində isə özək domenlər bir və ya iki multidomen polipeptidlər şəkilində qovuşmuşlar. ABC membran transporterlərin əksəriyyətində ATP birləşməsi və hidrolizi zülalların daşınmasını idarə edir. Amma, ATP birləşməsindən və hidrolizindən alınan enerji, aşağıda kistik fibroz transmembran keçirici zülal (CFTR) üçün təsvir edildiyi kimi, fasiləsiz davam edən kanalın açılması və qapanmasında da istifadə oluna bilir.

ATP ilə-İşləyən İon Nasosları Hüceyrə Membranlarından Keçən İon Qradientlərini Yaradır və Saxlayırlar

Sitozolun xüsusi ion tərkibi adətən hüceyrəni əhatə edən xarici mayenin ion tərkibindən güclü şəkildə fərqlənir. Virtual olaraq bütün hüceyrələrdə, mikrob, bitki, və heyvan hüceyrələri də daxil olmaqla, sitozolun pH-ı hüceyrəxarici pH-dan *asılı olmayaraq* 7.2-ə yaxın saxlanılır. Əksər ekstremal hallarda, mədənin daxili divarını təşkil edən epitel hüceyrələrinin sitozolunun pH ilə qidalanmadan sonra mədənin tərkibinin pH-ı arasında H^+ ionlarının qatılığında million dəfə fərq yaranır. Həmçinin, K^+ ionunun sitozol qatılığı Na^+ qatılığına nisbətən daha yüksəkdir. Həm onurğasızlarda hğm də onurğalılarda K^+ ionunun qatılığı sitozolda qandakına nisbətən 20-40 dəfə yüksək olduğu halda Na^+ qatılığı sitozolda qandakına nisbətən 6-12 dəfə aşğıdır (Cədvəl 11-2).

Sitozolda Ca^{2+} bir hissəsi ATP-də, həmçinin zülallarda və başqa molekullarda mənfi yüklənmiş qruplarla birləşmişdir, amma, bu birləşməmiş (və ya "sərbəst") Ca^{2+} ionunun qatılığıdır, bu da onların əzələ dartılmasındakı və siqnal yolundakı fəaliyyəti üçün kritik əhəmiyyətlidir. Sitozolda sərbəst Ca^{2+} qatılığı əsasən 0.2 mikromolyardan azdır (2×10^{-7} M), bu qandakından min dəfə və ya daha çox azdır. Bitki hüceyrələri və çox sayda mikroorqanizmlər, hətta hüceyrələr çox duruldulmuş duz məhlulunda kulturada yetişdirildikdə belə, bir-birinə bənzər şəkildə sitozolda yüksək K^+ qatılığını və aşağı Ca^{2+} və Na^+ qatılığını, saxlayırlar.

Bu bölmədə müzakirə olunan ion kanalları əsasən plazma və hüceyrədaxili membranlardan keçən adi ion qradientlərinin yaradılmasında və saxlanılmasında cavabdehdirlər. Hüceyrələr bu tapşırığın yerinə yetirilməsində xeyli enerji sərf edirlər.

Məsələn, böyrək və sinir hüceyrələrinin sintez etdiyi ATP-nin 25 faizə qədəri ion daşınmasında istifadə olunur, insanın eritrositləri isə onlarda olan ATP-nin 50 faizinə qədərini bu məqsədlə sərf edirlər; hər iki halda istifadə olunan bu ATP-nin əsas hissəsi Na^+/K^+ nasosunda sərf olunur (bax Şəkil 11-3). Bizim Fəsil 22-də ətraflı təsvir etdiyimiz kimi, alınan Na^+ və K^+ qradientləri sinir hüceyrələrində onların elektrik siqnallarını tez və səmərəli şəkildə keçirmə qabliyyəti üçün çox vacibdir. Bütün hüceyrələrdə zülalların sintezi üçün tələb olunan müəyyən fermemtlər K^+ ionlarının yüksək qatılığını tələb edir və Na^+ ionlarlnın yüksək qatılığında ingibirləşirlər, bu fermentlər Na^+/K^+ nasosunun əməliyyatı olmadan öz fəaliyyətlərini dayandırardılar. ATP sintezini ingibirləşdirən zəhərlə (məsələn, anaerob hüceyrələrdə 2,4-dinitrofenol) işlənilmiş hüceyrələrdə nasosun işləməsi dayanır və ionlar plazma membranın kanalları ilə elektrokimyəvi qradientin azalan istiqamətində aşağıya doğru spontan şəkildə hərəkət etdiyindən hüceyrələrin daxilində ion qatılıqları tədricən xarici mühitdəkinə çatır. Zəhərlə işlənilmiş hüceyrələr tədricən ölürlər, müəyyən mənada on görə ki, zülal sintezi yüksək qatılıqda K^+ ionlarını tələb edir, digər tərəfdən isə hüceyrə membranından keçən Na^+ qradientinin olmaması üzündən hüceyrələr amin turşuları kimi müəyyən qida maddələrini import edə bilmirlər (bax Şəkil 11-3). Belə zəhərlərin təsirinin tədqiq olunması nəticəsində ion nasoslarının mövcud olması və onların əhəmiyyəti barədə ilkin sübutlar əldə olunmuşdur.

Əzələ Boşalmaları Ca^{2+}-u Sitozoldan Sarkoplazma Şəbəkəsinə Vuran Ca^{2+} ATP-azalardan Asılıdır

Skelet əzələ hüceyrələrində, Ca^{2+} ionları endoplazmatik şəbəkənin (ER) xüsusi bir hissəsi olan **sarkoplazma şəbəkəsində** (**SR**) qatılaşdirilir və saxlanılır. Fəsil 17-də müzakirə olunduğu kimi, saxlanılan Ca^{2+}-un ion kanalları vasitəsi ilə SR lümenlərindən sitozola buraxılaması əzələlərin dartılmasına səbəb olur. Skelet əzələlərinin SR membranında yerləşən P-sinif Ca^{2+} ATP-aza Ca^{2+} ionlarını sitozoldan geriyə SR lümeninə vurur və bununla da əzələ boşalmalarını induksiya edir.

Skelet əzələ hüceyrələrinin sitozolunda, sərbəst Ca^{2+} qatılığı 10^{-7} M-dan (sakitlikdə olan hüceyrələrdə) 10^{-6} M-a və daha yüksəyə qədər (dartılan hüceyrələrdə) dəyişilir, halbuki *ümumi* Ca^{2+} qatılığı SR lümenlərində 10^{-2} M qədər yüksələ bilir. SR lümeni iki zəngin zülala malikdir, kalsekvestrin və yüksək afinli Ca^{2+} birləşdirən zülal kimi adlanan zülallar, bunlrın hər biri çoxsaylı Ca^{2+} ionlarını yüksək affinliklə birləşdirir. Bu zülalların SR lümenlərdə Ca^{2+} ionlarının çoxunu birləşdirməsi SR qovucuqlarında sərbəst Ca^{2+} ionlarının qatılığını aşağı salır. Bu, sitozolla SR lümeni arasında Ca^{2+} qatıllığı qradientini azaldır və uyğun olaraq Ca^{2+} ionlarının sitozoldan SR lümenlərinə vurulması üçün tələb olunman enerji miqdarını azaldır. Sitozolda sərbəst Ca^{2+} qatılığı artdıqca əzələnin Ca^{2+} ATP-aza fəallığı da artır. Skelet əzələ hüceyrələrində SR membranların kalsium nasosu plazma membranında yerləşən oxşar Ca^{2+} nasosları ilə birgə işləyir və sakitlikdə olan hüceyrələrdə sərbəst Ca^{2+}-un sitozolda qatılığının 0.1 μM-dan aşağı olmasını təmin edir.

CƏDVƏL 11-2 Tipik hüceyrədaxili və hüceyrəxarici ion qatılıqları

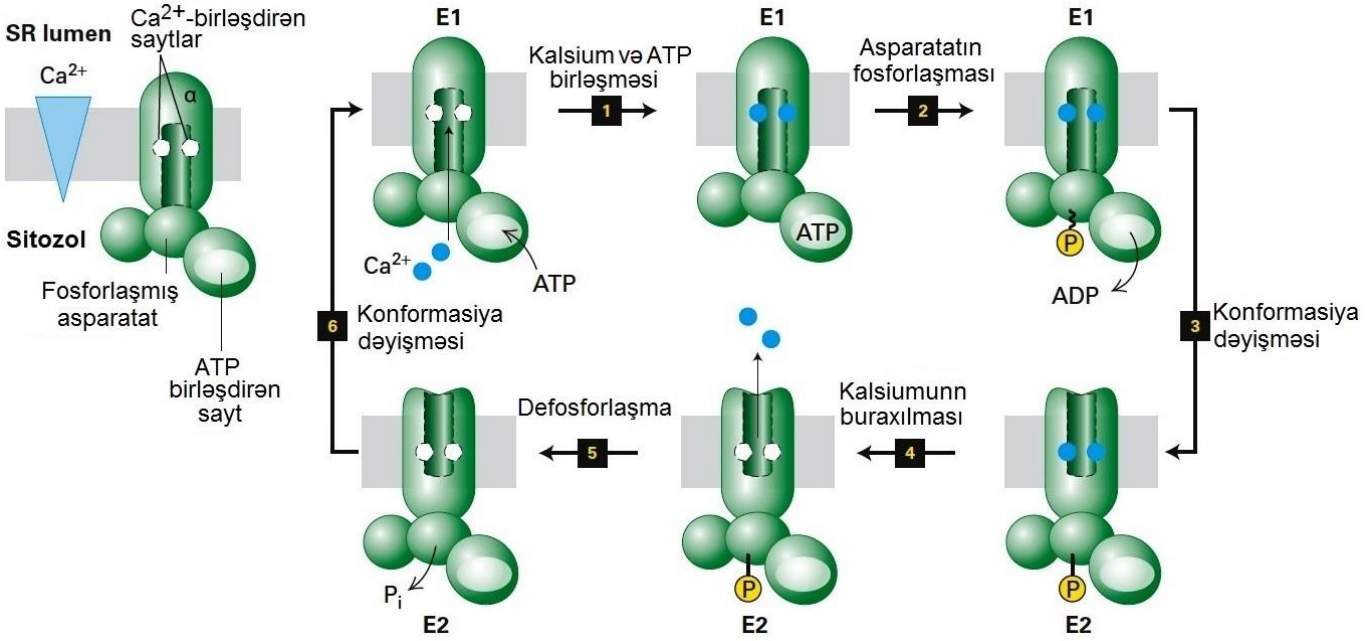
İon	Hüceyrədə (mM)	Qanda (mM)
Kalmarın aksony (dəniz onurğasızı)*		
K^+	400	20
Na^+	50	440
Cl^-	40-150	560
Ca^{2+}	0.0003	10
$X^{-\dagger}$	300-400	510
Məməilərin hüceyrəsi (onurğalılar)		
K+	139	4
Na+	12	145
Cl^-	4	116
HCO_3^-	12	29
X^-	138	9
Mg^{2+}	0.8	1.5
Ca^{2+}	<0.0002	1.8

*Elektrik impulslarının ötürücülük mexanizminin tədqiqində Kalmarın çox böyük sinir aksonu geniş şəkildə istifadə olunmuşdur.
†X^- qanda və hüceyrələrdə neytral pH olanda xalis mənfi yükə malik olan zülalları təmsil edir.

Ca^{2+} Nasosunun Fəaliyyət Mexanizmi Ətraflı Məlumdur

Kalsium nasoları əzələ SR membranlarında olan inteqral zülalların 80 faizindən çoxunu təşkil etdiyindən o başqa membran zülallarından asanlıqla ayrılıb təmizlənmiş və geniş şəkildə öyrənilmişdir. Bu zülalın üç-ölçülü quruluşunun, nasosun işləmə prosesinin müxtəlif mərhələlərini təmsil edən bir neçə konformasiya vəziyyətlərində təyin edilməsi onun fəaliyyət mexanizmi barədə çox şeyi aşkar etdi və P-sinif ATP-aza nasosların anlaşılmasında paradiqma rolunu oynayır.

Ca^{2+} ATP-azaların SR membranlarında fəaliyyət mexanizminin indiki modeli müxtəlif konformasiya vəziyyətlərini əhatə edir. Sadəlik üçün, biz bunları iki Ca^{2+} birləşdirmə saytlarının membrana-sarınan domenin mərkəzində yerləşdiyi və sitozola baxdığı E1 vəziyyətlərində və bu birləşmə saytlarının SR lümeninə istiqamətlənərək membranın eqzoplazmatik üzünə baxdığı E2 vəziyyətlərində qruplaşdırırıq. ATP hidrolizinin nasosla ion vurulması ilə birləşməsi zülalda bir neçə konformasiya dəyişikliyinə səbəb olur, bu da Şəkil 11-10-da göstərildiyi kimi, müəyyən edilmiş qaydada baş verməlidir. Zülal E1 konformasiyasında olduqda iki Ca^{2+} ionu sitozol tərəfdən əldə edilə bilən yüksək-affinli birləşmə saytına birləşir, baxmayaraq ki, hətta sitozolda Ca^{2+} qatılığı aşağı olduqda belə (bax Cədvəl 11-2), Ca^{2+} ionları yenə də bu saytı doldura bilir.



ŞƏKİL 11-10 Skelet əzələ hüceyrələrinin SR membranlarında Ca^{2+} ATP-azanın əməliyyat modeli. P-sinif nasosun iki katalitik α subvahidindən yalnız biri verilmişdir. E1 və E2 zülalların Ca^{2+} birləşdirən saytlarının uyğun olaraq sitozol və eqzoplazmatik (SR lümen) üzlər üçün mümkün olduğu alternativ konformasiyalarıdır. Burada diaqramda verildiyi kimi, pillələrin ardıcıl düzülüşü ATP hidrolizinin və Ca^{2+} ionlarının membrandan keçərək daşınmasının birləşməsi üçün çox əhəmiyyətlidir. Şəkildə ~P yüksək enerjili aspartil fosfat əlaqəsini bildirir; -P aşağı enerjili əlaqəni bildirir. Ca^{2+}-un E1-in sitozola-baxan Ca^{2+} birləşdirmə saytına olan affinliyi E2-nin eqzoplazmatik üzə baxan birləşmə saytına olan affinliyindən min dəfə çox olduğundan bu nasos Ca^{2+}-u sitozoldan SR lümenlərinə bir istiqamətli daşıyır. Daha ətraflı tekstə və Şəkil 11-11-ə bax. Bax C.Toyoshima and G. Insei, 2004, *Ann.Rev.Biochem.***73**:269-292.

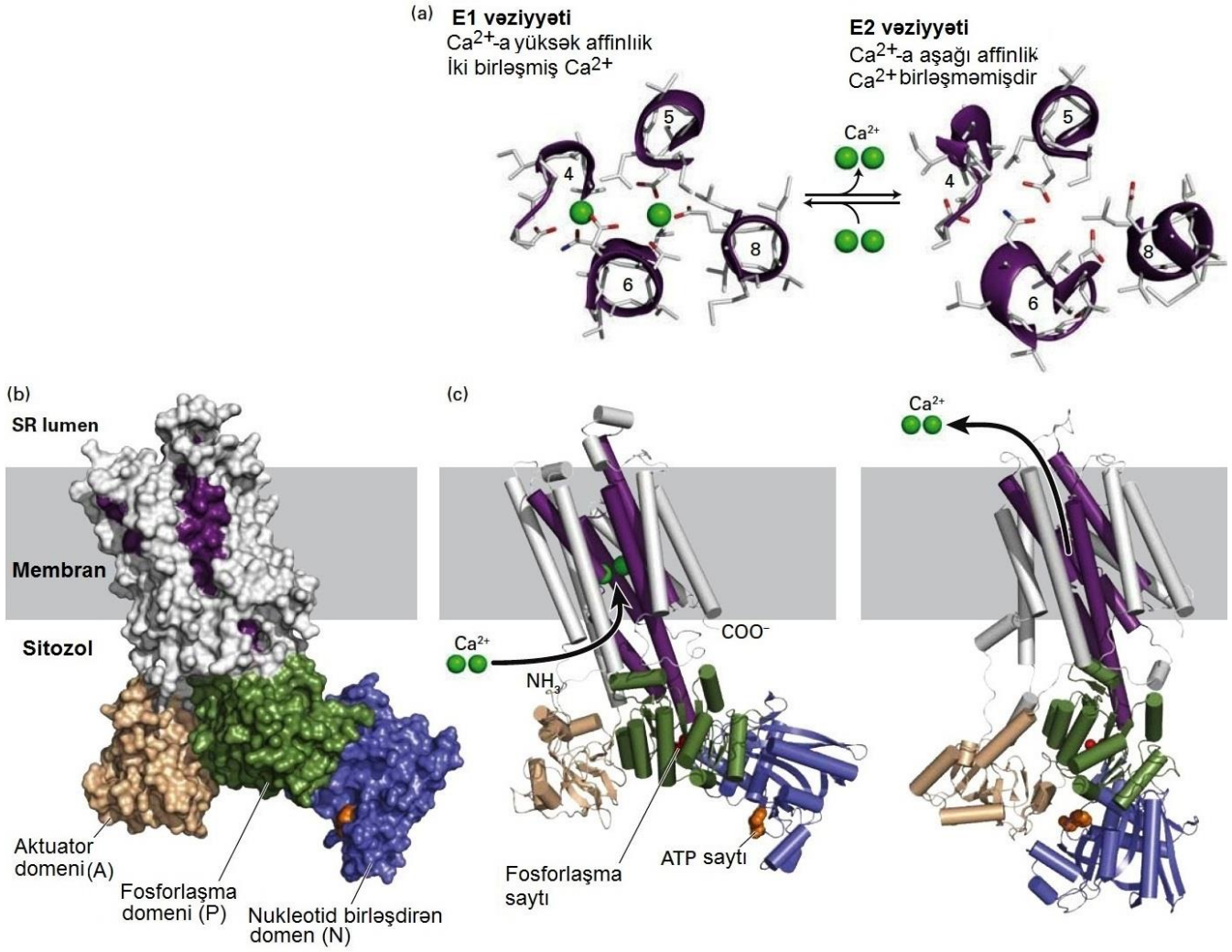
Növbəti pilləda, ATP sitozol üzündəki mərkəzə birləşir (pillə 1). Birləşmiş ATP Mg^{2+} ionlarının tələb olunduğu reaksiya ilə ADP-yə hidroliz olunur və azad olmuş fosfat zülaldakı spesifik aspartat qalığına keçirilir və E1~P kimi qeyd olunan yüksək enerjili asil fosfat birləşməsini əmələ gətirir (pillə 2). Sonra, zülal E2-ni əmələ gətirən konformasiya dəyişikliyinə uğrayır, burada iki Ca^{2+} birləşdirən mərkələrzin afinliyi azalır (detalları növbəti şəkildə verilir) və bu saytlar SR lümenləri üçün əlçatan olur (pillə 3). E1~P-də asparatil fosfat birləşməsinin hidrolizindən ayrılan sərbəst enerji E2–P-dəkindən çoxdur və asparatil fosfat birləşməsinin sərbəst enerjisində belə azalma demək olar ki, E1 → E2 konformasiya dəyişikliyini enerji ilə təmin edir.

Ca^{2+} ionları SR lümenlərinə daxil olmaq üçün spontan şəkildə aşağı affinli saytlardan dissosasiya edirlər, çünki hətta Ca^{2+} qatılığı orada sitozola nisbətən daha yüksək olsa da, o aşağı-affinlik vəziyyətində Ca^{2+} birləşməsi üçün K_d-dən aşağıdır (pillə 4). Nəhayət, asparatil-fosfat birləşməsi hidroliz olunur (pillə 5). Sitozol Ca^{2+}-un daha sonra yüksək-afinli E1 Ca^{2+} birləşmə mərkəzinə birləşməsi ilə cütləşən bu defosforlaşma, E2-yə nisbətən E1 konformasiya vəziyyətini stabilləşdirir, bunu E2 → E1 konformasiya dəyişilməsi gücü adlandırmaq olar (pillə 6). İndi E1 daha iki Ca^{2+} ionlarını daşımağa hazırdır. Beləliklə dövrə tamamlanır və ATP-nin fosfoanhidrid əlaqələrinin hidrolizı 2 Ca^{2+} ionunun SR lümenlərinə, öz qatılıq qradientlərinə qarşı nasosla vurulmasını enerji ilə təmin edir.

Əksər quruluş və biofiziki dəlillər Şəkil 11-10-da olan modeli dəstəkləyir. Məsələn, əzələ kalsium nasosu əsas asparatat qalığı ilə əlaqəli olan fosfatla birlikdə ayırılmışdır və spektroskopik analizlər, E1 → E2 çevrilməsində zülalın konformasiyasında yüngül dəyişikliyi aşkar etdi. Bu iki fosforlaşmış vəziyyət biokimyəvi yolla da fərqləndirilə bilər, ADP-nin fosforlaşmış E1-ə əlavə olunması Şəkil 11-10-da pillə 2-nin əksi ilə, ATP-nin sintezi ilə nəticələnir, amma ADP-nin fpsforlaşmış E2-yə əlavə olunmasında isə bu baş vermir. Reaksiya dövrəsinin hər bir prinsipal konformasiya vəziyyəti, tripsin kimi proteolitik fermentlərə qarşı müxtəlif həssaslığı ilə də xarakterizə oluna bilər.

Şəkil 11-11 Ca^{2+} nasosunun E1 vəziyyətində üç-ölçülü quruluşunu göstərir. Şəkil 11-11c-dən göründüyü kimi, 10 membrana-sarınan α spiral katalitik subvahiddə Ca^{2+} ionlarının keçib getdiyi keçid-yolunu əmələ gətirir. Bu spiralların dördünün amin turşuları iki yüksək-afinli E1 Ca^{2+} birləşmə saytlarını əmələ gətirir (Şəkil 11-11a *solda*). Bir sayt, qlutamat və asparatat qalıqlarının yan zəncirlərinin karboksil qrupularının (COO^-) mənfi yüklənmiş oksigen atomlarından və eləcə də su molekullarından əmələ gəlmişdir. Digər mərkəz isə, yan- və əsas-zəncirin oksigen atomlarından əmələ gəlmişdir. Beləliklə, Ca^{2+} ionları Ca^{2+} nasosuna birləşir, onlar su məhlullarında normal halda Ca^{2+} ilə əhatə olunan su molekulunu itirirlər (bax Şəkil 2-7), amma bu sular oxşar geometriyada nəqliyyat zülalının hissəsi olan oksigen atomları ilə əvəz olunurlar. Əksinə, E2 vəziyyətində, (Şəkil 11-11a, *sağda*) bu birləşdirici yan zəncirlərin bir neçəsi nanometrin kiçik bir hissəsi qədər hərəkət edir və birləşmiş Ca^{2+} ionları ilə qarşılıqlı əlaqəyə girə bilmirlər, bu da E2 vəziyyətinin Ca^{2+} ionları üçün aşağı affinliyini göstərir.

Ca^{2+} ionlarının Ca^{2+} nasosuna birləşməsi kanallara və nəqliyyat zülallarına ion birləşməsinin əsas prinsiplərini təsvir edir, bu fəsildə biz buna təkrar-təkrar rast gələcəyik: ionlar birləşərkən onlar öz hidratlaşma suyunun əksər hissəsini itirirlər, amma su məhlulunda onlara birləşmiş su oksigeni ilə oxşar geometriyada olan, nəqliyyat zülalındakı oksigen atomları ilə əlaqəyə girirlər. Bu, ionların zülallara birləşməsi üçün termodinamik baryeri azaldır və hətta nisbətən aşağı qatılıqlı məhlulda ionların möhkəm birləşməsinə imkan verir.



ŞƏKIL 11-11 Əzələ Ca^{2+} ATP-azasının kataliik α subvahidinin quruluşu. (a) Ca^{2+}-birləşdirən saytlar iki birləşmiş kalsium ionu ilə E1 vəziyyətində (*solda*), və birləşmiş ionların olmadığı aşağı-afinli E2 vəziyyətində (*sagda*). Əsas amin turşularının yan zəncirləri ağdır və qlutamat aspartatın yan zıncirlərində oksigen atomları qırmızıdır. Yüksək affinli E1 konformasiyada, Ca^{2+} ionları, membran daxilində 4, 5, 6 və 8-ci spiralların arasında iki saytda birləşirlər. Saytlardan biri, qlutamat və asparatatın yan zəncirlərinin və su molekullarının (göstərilmir) mənfi yüklənmiş oksigen atomlarından əmələ gəlmişdir, digəri isə yan- və əsas-zəncir oksigen atomlarından əmələ gəlmişdir. Yeddi oksigen atomu hər iki saytda Ca^{2+} ionunu əhatə edir. (b) Zülalın E1 vəziyyətdə rentgen struktur kristalloqrafiya ilə təyininə əsaslanan üç-ölçülü modeli. 10 transmembran α spiralı vardır, bnlardan dördü (bənövşəyi) Ca^{2+} ionlarının birləşməsində iştirak edən qalıqlara malikdir. Sitozol seqmenti üç domeni əmələ gətirir: nukleotid-birləşdirən domen (N, mavi), fosforlaşma domeni (P, yaşıl) və hərəkətverici (actuator) domeni (A, bej) iki membrana-sarınan spiralı birləşdirir. (c) Nasosun E1 vəziyyətində (*sold*a) və E2 vəziyyətində (*sağda*) modelləri. N və A domenlərin konformasiyalarında E1 və E2 vəziyyətlər arasında fərqlərə diqqət edin. Bu domenlərin hərəkəti Ca^{2+}-birləşdirən saytları təşkil edən membrana-sarınan α spiralların (bənövşəyi) konformasiya dəyişilmələrinə güc verir, onları Ca^{2+}-birləşdirən saytların sitozol üzündə (E1 vəziyyəti) əlçatan olan bir konformasiyadan, indi zəif birləşmiş Ca^{2+} ionlarının eqzoplazmatik üzə (E2 vəziyyəti) əlçatan olduğu başqa konformasiyaya çevirir. [Verilənlər C.Toyoshima and G. İnesi, 2004, *Ann.Rev.Biochem*. **73**:269-292, PDB ID 1su4; və K. Obara et al., 2005, *P. Natl. Acad.Sci. USA* **102**:14489–14496, PDB ID 1agv.]

Ca^{2+} nasosunun sitoplazmatik rayonu, E1 vəziyyətində bir-birindən çox yaxşı ayrılmış üç domendən təşkil olunmuşdur (Şəkil 11-11b). Bu domenlərin hər biri amin turşularının qısa seqmentləri vasitəsilə membrana-sarınan spirallara birləşir. Nasosun işləmə tsikli zamanı bu sditozol domenlərinin hərəkəti birləşdirici seqmentlərin hərəkətinə səbəb olur, bu da birləşmiş

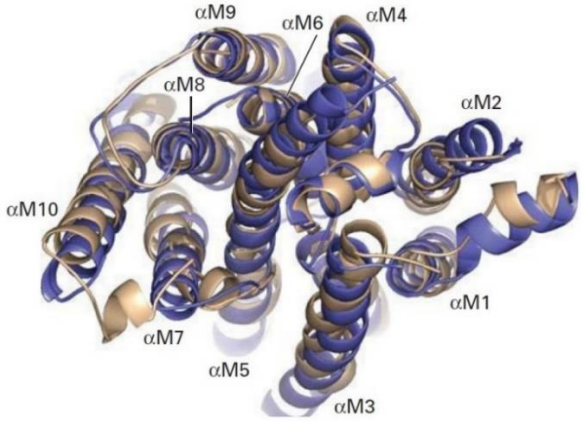
membrana-sarınan α spiralların hərəkətinə ötürülür. Məsələn, dosforlaşmış Asp 351 qalığı fosforlaşma (P) domenində yerləşir. ATP-nin adenozin hissəsi nukleotid-birləşdirən (N) domeninə birləşir, amma ATP-nin γ-fosfatı P domenindəki xüsusi qalıqlara birləşir və N və P domenlərin hər ikisinin hərəkətini tələb edir. Beləliklə, ATP və Ca^{2+} birləşməsinin ardınca, birləşmiş ATP-nin γ-fosfatı, fosfatı qəbul etməli olan P domenində aspartata çox yaxın oturur. Baxmayaraq ki, bunların və digər zülalların konformasiya dəyişikliklərinin dəqiq detalları hələ tam məlum deyil, P və N domenlərin hərəkəti birləşdirici seqmentlərin lingə-bənzər (qola-bənzər) hərəkəti ilə bir sıra membrana-sarınan α spiralların yenidən düzülməsinə ötürülür. Bu dəyişikliklər xüsusən, iki Ca^{2+} birləşmə saytlarına malik olan dörd spiralda baş verir: bu konformasiya dəyişiklikləri birləşmiş Ca^{2+} ionları azad olarkən onların yenidən geriyə, sitozola qayıtmasına mane olur, amma onların eqzoplazmatik sahədə (lümendə) dissosasiya olunmasına imkan yaradır.

Bütün P-sinif ion nasosları, hansı ionları daşımalarından asılı olmayaraq, daşınma prosesində yüksək konservativliyə malik olan asparatat qalığında fosforlaşırlar. kDNT ardıcıllığından alındığı kimi, bu günə qədər öyrənilmiş bütün P nasosların katalitik α subvahidləri oxşar aminturşu ardıcıllığına malikdirlər və beləliklə guman olunur ki, transmembran α spirallar və sitozola baxan A (aktuator - hərəkətverici), P və N domenləri oxşar tənzimlənmələrinə malikdirlər (bax Şəkil 11-11). Bu kəşflər qəti şəkildə göstərir ki, bütün belə zülallar ümumi sələfdən törəmişlər, hərçənd ki, indi onlar müxtəlif ionları daşıyırlar. Bu ehtimal, Na^+/K^+ ATP-azaların membrana-sarınan seqmentlərinin üç-ölçülü quruluşlarının Ca^{2+} nasosunun membrana-sarınan seqmentlərinin üç-ölçülü quruluşlarına oxşarlığı ilə təsdiqlənir (Şəkil 11-12), üç sitoplazmatik domenin molekulyar quruluşları da həmçinin çox oxşardır. Beləliklə, Şəkil 11-11-dəki əməliyyat modeli əsasən bütün P-sinif ATP-ilə-işləyən nasoslara aid edilə bilir.

Kalmodulin Sitozolda Ca^{2+} Qatılığını Nizamlayan Plazma Membranı Nasoslarını Tənzimləyir

Bizim Fəsil 15-də izah etdiyimiz kimi, əzələ hüceyrələri ilə yanaşı çoxsaylı müxtəlif hüceyrə tiplərində sitozolda sərbəst Ca^{2+} ionlarının qatılığındakı kiçik artma hüceyrənin müxtəlif cavab reaksiyalarının başlanmasına səbəd olur. Ca^{2+}-un hüceyrədaxili siqnalda fəaliyyət göstərməsi üçün Ca^{2+} ionlarının qatılığı sitozolda sərbəst şəkildə 0.1-0.2 μM-dan aşağı saxlanılmalıdır. Heyvan, maya və ehtimal ki, bitki hüceyrələri, Ca^{2+} ionlarını onların qatılıq qradientlərinə qarşı hüceyrədən kənara daşıyan plazma membranı Ca^{2+} ATP-azanı ekspressiya edirlər. Bu P-sinif nasosların katalitik α subvahidi, quruluşuna və ardıcıllığına görə, əzələ SR Ca^{2+} nasosunun α subvahidi ilə oxşardır.

Plazma membranı Ca^{2+} ATP-azaların fəallığı, sitozol Ca^{2+}-birləşdirən zülal **kalmodulinlə** tənzimlənir (bax Şəkil 3-33). Sitozolda Ca^{2+}-un artması Ca^{2+} ionlarının kalmodulinə birləşməsini induksiya edir, o isə öz növbəsində Ca^{2+} ATP-azaların fəallşmasına səbəb olur. Nəticədə, Ca^{2+} ionlarının hüceyrədən eksport olunması, sakitlikdə olan hüceyrələr üçün xarakterik olan sərbəst sitozol Ca^{2+} ionlarının aşağı qatılığının bərpa olunmasını sürətləndirir.



ŞƏKIL 11-12 Na^+/K^+ ATP-aza və əzələ Ca^{2+} ATP-azaların quruluş müqayisəsi. Sitoplazmatik səthdən görünüdüy kimi, Na^+/K^+ ATP-azanın (qızılı) üç-ölçülü quruluşu əzələ Ca^{2+} ATP-azaların (bənövşəyi) üç-ölçülü quruluşu ilə müqayisə edilir. αM1- αM10 Na^+/K^+ ATPazaların 10 membrana-sarınan α-spirallarını göstərir. [Verilənlər J.P. North et al., 2007, *Nature* **450**:1043, PDB ID 3b8e; və C toyoshima, H. Nomura and T. Tsuda, 2004, Nature, 432:361-368, PDB ID 1wpg.]

Na^+/K^+ ATPaza Heyvan Heceyrələrində Hüceyrədaxili Na^+ və K^+ Qatılıqlarını Saxlayır

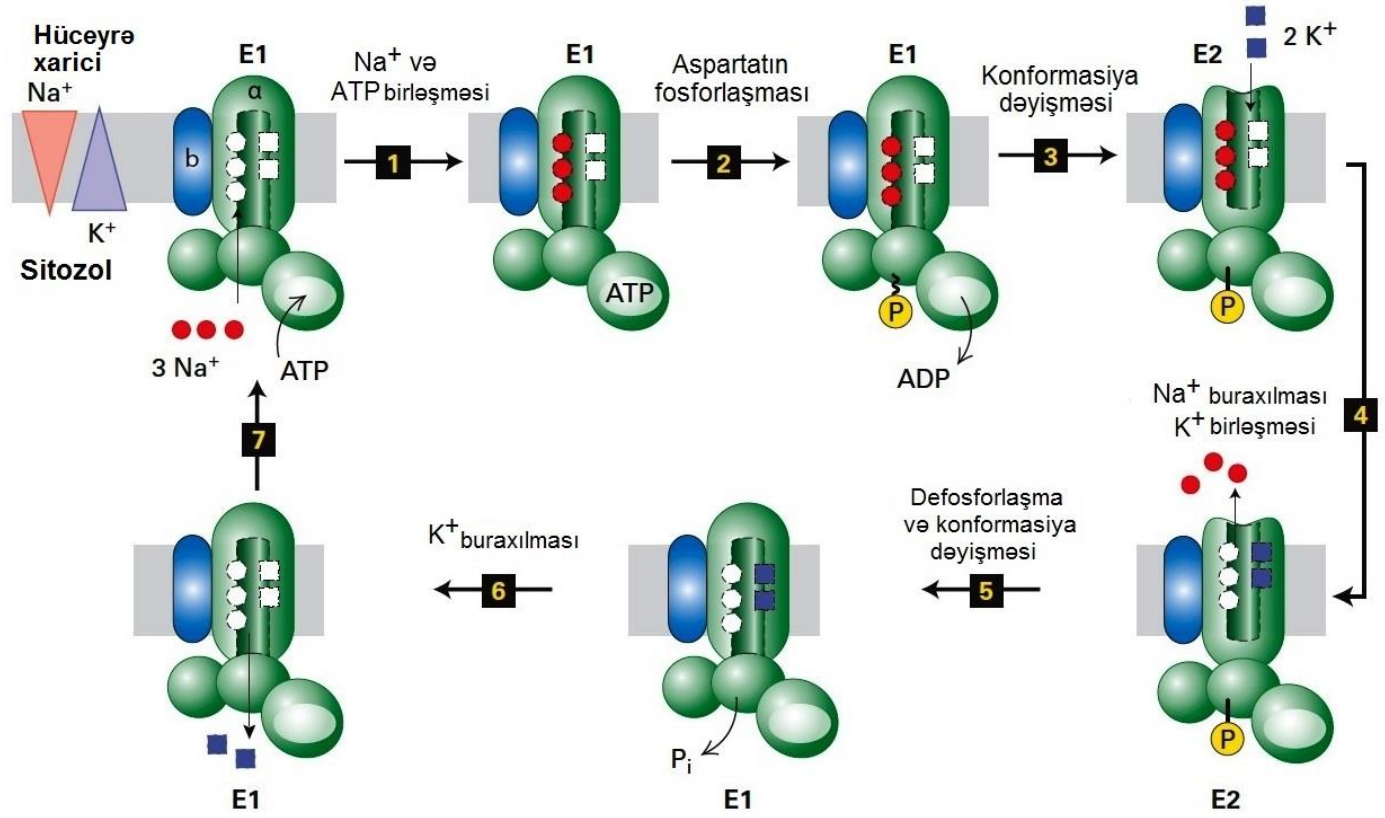
Bütün heyvan hüceyrələrinin plazma membranında mövcud olan çox əhəmiyyətli P-sinif nasosu **Na^+/K^+ ATP-aza**dır. Bu ion nasosu, $\alpha_2\beta_2$ subvahidlər tərkibinin tetramerdir və Ca^{2+} nasosları ilə homoloji quruluş oxşarlığına malikdir (bax Şəkil 11-12). Kiçik, qlikozilləşmiş β transmembran polipeptid, görünür ki, birbaşa ion vurulmasında iştirak etmir. Na^+/K^+ ATP-azanın katalitik dövrəsi zamanı, o hər bir ATP molekulunun hidrolizində üç Na^+ ionunu hüceyrə *xaricinə* və iki K^+ ionunu hüceyrə daxilinə vurur. Na^+/K^+ ATP-azanın, Şəkil 11-13-də verilmiş fəaliyyət mexanizmi əzələ SR kalsium nasosunun fəaliyyət mexanizminə oxşardır, istisna odur ki, ionlar membrandan keçən *hər iki istiqamətdə* hər bir ionun öz qatılıq qradientinə *qarşı* hərəkət etməsi ilə vurulur. Na^+/K^+ ATP-aza özünün E1 konformasiyasında, zülalın sitozol üzündə əlçatan olan üç yüksək-afinlikli Na^+-birləşdirən saytlara və iki aşağı afinlikli K^+-birləşdirən saytlara malikdir. Na^+ ionlarının bu sitozol saytlarına birləşməsi üçün K_m 0.6 mM-dur, bu qiymət ~12 mM olan hüceyrədaxili Na^+ qatılığından, kifayət qədər aşağıdır, nəticədə Na^+ ionları normal olaraq bu saytları tamamilə zəbt edir. Əksinə, sitozol K^+-birləşdirən mərkəzlərin afinliyi kifayət qədər aşağıdır, zülalla daxilə daşınan K^+ ionları, hüceyrədaxili K^+ qatılığının yüksək olmasına baxmayaraq E1-dən sitozola dissosasiya olunur. E1 → E2 keçidi zamanı üç birləşmiş Na^+ ionları eqzoplasmatik üz üçün əlçatan olur və eyni zamanda üç Na^+ birləşdirən saytların affinliyi azalır. İndi, aşağı afinli Na^+ saytlarına birləşmiş üç Na^+ ionu, hüceyrəxarici Na^+ qatılığının yüksək omasına baxmayaraq bir-bir hüceyrəxarici mühitə dissosasiya edirlər. E2 konformasiyasına keçid də, eqzoplazmatik üzdən əlçatan olan iki yüksək affinlikli K^+ saytlarını yaradır. Bu saytlara K^+ birləşdirməsi üçün K_m (0.2 mM) hüceyrəxarici K^+ qatılığından (4 mM) aşağı olduğundan, bu saytlar Na^+ ionları dissosasiay edən kimi K^+ ionları ilə dolur.

Buna oxşar olaraq, sonrakı E2 → E1 keçidi zamanı iki birləşmiş K^+ ionları içəriyə daşınır və sonra sitozola buraxılır.

Bəzi dərmanlar (məsələn, ouabain və diqoksin) plazma membranı Na^+/K^+ ATP-azanın eqzoplazmatik domeninə birləşir və spesifik olaraq onun ATP-aza fəallığını ingibirləşdirilər. Nəticədə, hüceyrələrin Na^+/K^+ tarazlığının belə pozulması, bu ion nasoslarının normal K^+ və Na^+ ion qatılıqları qradientlərinin saxlanılmasındakı kritik rolunu güclü şəkildə sübut edir. Klassik Eksperiment 11.1, həyat üçün tələb olunan bu əhəmiyyətli fermentin kəşfini təsvir edir.

V-Sinif H^+ ATP-azalar Lizosomların və Vakuolların Fəallığını Saxlayır

Bütün V-sinif ATP-azalar, yalnız H^+ ionlarını daşıyırlar. Lizosomların, endosomların və bitki vakuollarının membranlarında mövcud olan bu proton nasosları orqanoidlərin lümenlərini turşlaşdırmaq üçün fəaliyyət göstərirlər. Lizosomal lümenin pH-ı canlı hüceyrələrdə, pH-a həssas fluoressent boya zərrəciklərindən istifadə etməklə dəqiqliklə ölçülə bilər. Bu zərrəciklər hüceyrəxarici mayeyə əlavə ediləndə hüceyrələr onları udaraq mənimsəyir (Faqositez; bax Şəkil 1-18 və Fəsil 17) və sonda onları lizosomlar daxilinə keçirir. Lizosomal pH buraxılan fluoressensiyanın spektrindən hesablana bilər. Fluoressensiyası pH-dan asılı olan, təbii fluoressent zülalları kodlaşdıran DNT elə modifikasiya oluna bilər ki, (ətraflı şəkildə Fəsil 13 və 14-də verilmiş, "siqnal ardıcıllıqlarını" kodlaşdıran DNT seqmentinin əlavə olunması ilə) zülal lizosom lümeninə hədəf oluna bilsin, sonra fluoressensiya ölçmələri orqanoidin lümenlərində pH-ı təyin etmək üçün istifadə oluna bilsin. Lizosomal lümenlərlə (pH- ~4.5–5.0) sitozol (pH-~7.0) arasımda proton qradirntinin yüzqat və ya daha artıq təmin olunması V-sinif ATP-azalardan, beləliklə də hüceyrədə ATP istehsalından asılıdır. Lizosomların aşağı pH-nın olması çox proteazaların, nukleazaların və digər hidrolitik fermentlərin lümendə fəaliyyəti üçün əhəmiyyətlidir, digər tərəfdən, sitozolda



ŞƏKİL 11-13 Plazma membranı Na^+/K^+ ATP-azanınn fəaliyyət modeli. P-sinif nasosların iki katalitik α subvahidindən yalnız biri verilmişdir. Bir ATP-aza molekulunun yalnız bir subvahidinin yoxsa hər iki subvahidinin ion daşımağı hələ məlum deyildir. Na^+/K^+ ATP-aza ilə ion vurulması, əzələ Ca^{2+} ATP-azalarında olduğu kimi, fosforlaşma, defosforlaşma və konformasiya dəyişikliklərini əhatə edir (bax Şəkil 11-11). Bu halda, E2-P aralıq məhsulun hidrolizi E2 → E1 konformasiya dəyişikliyinə və onu müşayət edən iki K^+ ionlarının daxilə daşınmasına güc verir. Na^+ ionları qırmızı dairələrlə, K^+ ionları bənövşəyi kvadratlarla, yüksək-enerjili asil-fosfat rabitələri ~P ilə, aşağı enerjili fosfoefir əlaqələri isə -P ilə işarələnir.

pH 5 olsaydı pH 7-də optimallaşmış çox fermentlətin fəaliyyəti qırılardı və hüceyrənin ölümünə səbəb olardı.

Müqayisəli dərəcədə az protonun vurulması hüceyrədaxili qovucuqların turşulaşması üçün tələb edilir. Bunun niyə belə olduğunu anlamaq üçün, xatırladaq ki, pH-4 olan məhlul hər litrdə 10^{-4} mol H^+ ionlarına və ya hər millilitrdə 10^{-7} mol H^+ ionuna malik olur. Hər bir mol H-də 10^{23} atom (Avoqadro ədədi) olduğundan, pH 4 məhlulun millilitrində 6.02×10^{16} H^+ ionu olur.

Beləliklə, pH 4-də həcimi 4.18×10^{-15} ml olan əsas sferik lizosom (diametri 0.2μm) cəmisi 252 protona malik olmalıdır. pH 7 olduqda eyni orqanoid özünün lümenində orta hesabla yalnız 0.2 protona malik olacaqdır, beləliklə, yalnız təxminən 250 protonun vurulması lizosomun tuşulaşması üçün lazımdır.

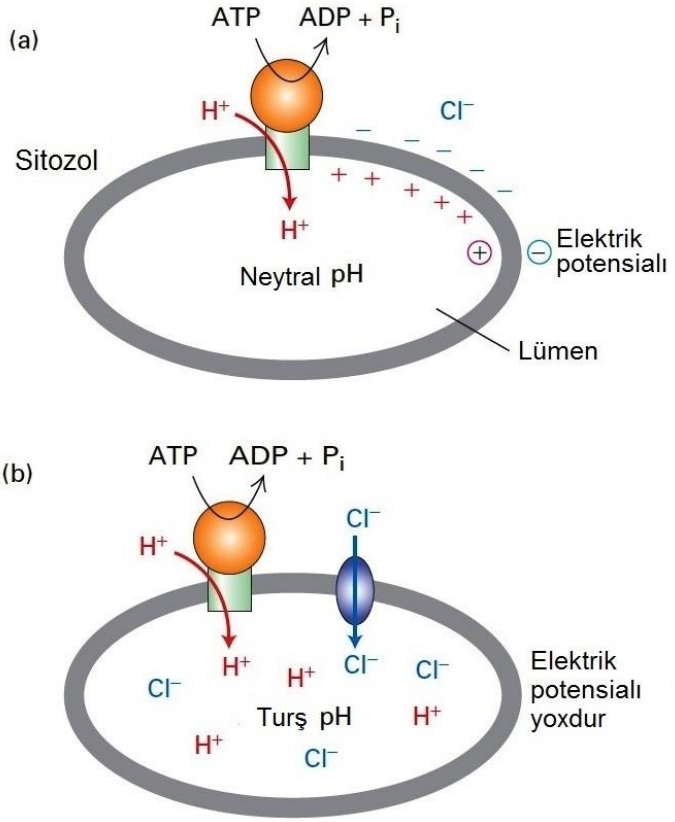
ATP-ilə-işləyən proton nasosları orqanoid lumenlərini (və ya hüceyrəxarici sahəni) turşlaşdıra bilmir, çünki bu nasoslar *elektrogendirlər*, yəni, elektrik yükünün xalis hərəkəti daşınma zamanı baş verir. Yalnız çox az protonun nasosla vurulması orqanoid membranının eqzoplazmatik (daxili) üzündə müsbət yüklənmiş H^+ ionlarının toplanmasına səbəb olur. Membrandan vurulmuş hər bir H^+ üçün, mənfi ion (məsələn, OH^- və ya Cl^-) sitozol üzündən "arxada qalacaq" və orada mənfi yüklənmiş ionların toplanmasına səbəb olacaq. Bu əks yüklənmiş ionlar membranın əks üzlərində bir-birini cəzb edərək, membrandan keçən yük ayrılmasını və ya elektrik potensialını əmələ gətirəcək. Beləliklə, lizosom membranı elektrik dövrəsindəki kondensator, yüklənmiş zərrəciklərin keçməsi üçün qeyri-keçirici olan maneənin əks tərəflərində əks yüklərin (anionların və kationların) saxlanılması kimi fəaliyyət göstərir.

Getdikcə daha çox proton vurulduqca və eqzoplazmatik üzdə daha çox müsbət yükləri toplandıqca, yüksələn elektrik potensialı qradientinə qarşı əlavə protonların keçməsi üçün tələb olunan enerjinin miqdarı dramatik şəkildə artır və əhəmiyyətli transmembran H^+ qatılıq qradienti yaradılmazdan çox öncə əlavə protonların vurulmasının qarşısını alır (Şəkil 11-14a). Faktiki olaraq, bu P-sinif H^+ nasoslarının bitki və maya plazma membranından keçən sitozol-mənfi potensialı yaratdığı bir yoldur.

Orqanoid lümeninin və ya hüceyrəxarici sahənin (məsələn mədə lümeninin) turş olması üçün protonların keçməsi, ya (1) bərabər sayda anionların (məsələn, Cl^-) eyni istiqamətdə keçməsi ilə, ya da (2) bərabər sayda müxtəlif kationların əks istiqamətdə keçməsi ilə müşayət olunmalıdır. Birinci proses, membranlarında V-sinif H^+ ATP-azalar və onu müşayət edən Cl^- ionlarının keçdiyi anion kanalları olan lizosomlarda və bitki vakuollarında baş verir (Şəkil 11-14b). İkinci proses isə, elektrogen olmayan və xaricə bir H^+, daxilə isə bir K^+ vuran P-sinif H^+/K^+ ATP-azaya malik olan mədənin içəri divarında baş verir. Bu nasosun fəaliyyəti bu fəsildə sonra mezakirə olunur.
Lizosom və vakuol membranlarında ATP ilə-işləyən proton nasosları həll olan hala gətirilmiş, təmizlənilmiş və liposomlara keçirilmişdir. Şəkil 11-9-dan göründüyü kimi, bu V-sinif proton nasosları iki diskret domenə malikdirlər: hidrofil sitozol domeni (V_1) və transmembran domeni (V_0), hər bir domeni çoxsaylı subvahidlər əmələ gətirirlər. ATP-nin V_1-də B subvahidlər tərəfindən birləşməsi və hidrolizi V_0-da **c** və **a** subvahidlərindən yaranan proton-keçirən kanallar vasitəsi ilə H^+ ionlarının vurulmasını enerji ilə təmin edir. P-sinif ion kanallarından fərqli olaraq V-sinif proton kanalları proton daşınması zamanı fosforlaşmırlar və defosforlaşmırlar.

ABC Zülalları Geniş Müxtəliflikdə Dərmanları və Toksinləri Hüceyrədən Çıxarırlar

Əvvəllər qeyd olunduğu kimi, çox geniş və müxtəlif olan ABC superailəsi nəqliyyat zülallarının bütün nümayəndələri iki transmembran domenə (T) və iki sitozol ATP-birləşdirən (A) domenə malikdirlər (bax Şəkil 11-9). T domenlərin hər biri 10 membrana-sarınan α spiraldan təşkil olunaraq, maddənin (substratın) membranı keçərək daşındığı keçid yolunu əmələ gətirir (Şəkil 11-15a) və hər bir ABC zülalın substrat spesifikliyini təyin edir. A domenlərinin ardıcıllığı superailənin bütün üzvlərində təxminən 30-40 faiz homologiya təşkil edir, bu da onların təkamülcə ümumi bir mənşədən yarandığını göstərir



ŞƏKİL 11-14 V-sinf proton nasoslarının hüceyrə membranından keçən H^+ qatılıq qradientinə və elektrik potensialı qradientinə təsiri. (a) Əgər hüceyrədaxili orqanoidlər yalnız V-sinif nasoslara malikdirsə, nasosla proton vurulması membranda elektrik potensialını yaradır (sitozola baxan tərəf mənfi və lümenal tərəf müsbət), amma lümendaxili pH-da əhəmiyyətli dəyişilmə baş vermir. (b) Əgər orqanoidin membranı Cl^- ion kanallarına da malikdirsə, anionlar passiv şəkildə nasosla vurulan protonların ardlnca axıb keçəcək, nəticədə H^+ və Cl^- ionlarının lümendə toplanmasına səbəb olacaq (aşağı lümenal pH), amma membrandan keçən elektrik potensialı yaranmayacaq.

İlk kəşf olunan eukariot ABC zülalı şiş hüceyrələri üzərindəki tədqiqatlardan və bir sıra yaxın olmayan quruluşa malik olan dərmanlara qarşı dözümlülük nümayiş etdirən kultura olunan hüceyrələrin tədqiqatlarından aşkar olmuşdur. Belə hüceyrələr tədricən sonda, əvəllər *MDR1* adlanan *çoxsaylı dərmanlara-dözümlülük nəqliyyat zülalları* (*multidrug-resistance – MDR transport protein*) kimi məlum olan, indi isə ABCB1 kimi tanınan zülalların yüksək səviyyədə ekspressiyasını numayiş etdirirlər. Bu zülal, geniş müxtəliflikfdə dərmanları sitozoldan hüceyrə xarici mühitə *çıxarmaq* (*eksport etmək*) üçün ATP hidrolizindən ayrılan enerjidən istifadə edir. *Mdr1* geni çoxsaylı-dərmanlara-dözümlü hüceyrələrdə tez-tez

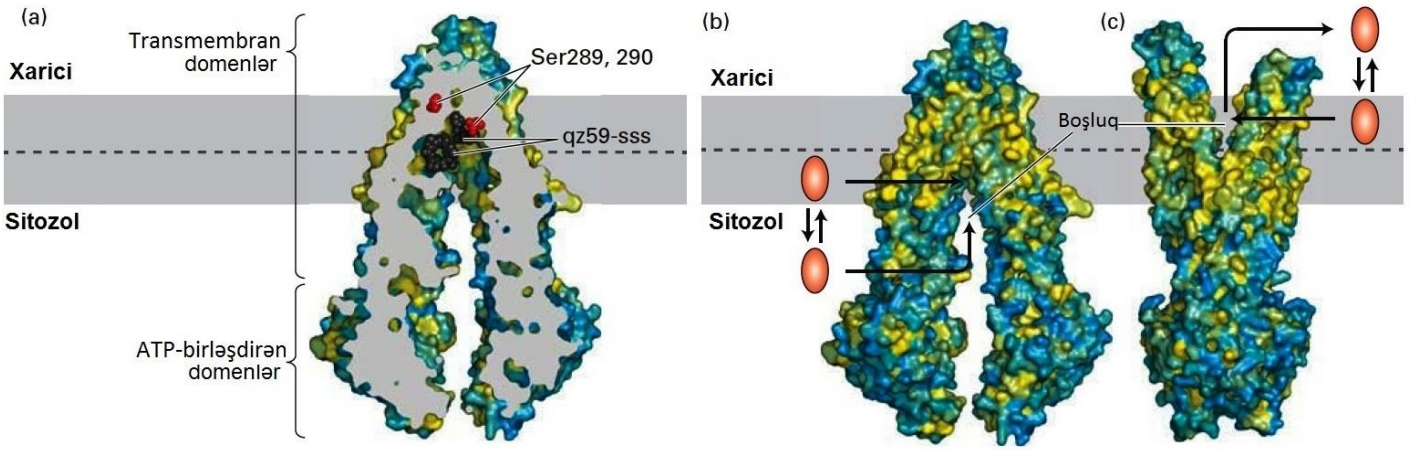
ekspresiya olunur və MDR1 zülalın həddən artıq istehsalı ilə nəticələnir. Dörd diskret subvahiddən təşkil olunmuş bakterial ABC zülallardan fərqli olaraq, məməlilərin ABCB1 zülalının bütün dörd domeni 170 kDa molekul çəkili vahid zülalda birləşmişlər.

Məməlilərdə ABCB1-in substratı əsasən bir və ya daha artıq müsbət yüklərə mlik olan lipiddə-həll olan yastı (müstəvi) molekullardır, onlar daşınmaq üçün bir-biri ilə həmişə rəqabətdədirlər, bu da göstərir ki, onların hamısı zülalda eyni və ya üst-üstə düşən saytlara birləşirlər. ABCB1 ilə daşınan çox dərmanlar nəqliyyat zülallarının köməyi olmadan hüceyrəxarici mühitdən hüceyrə sitozolu daxilinə diffuziya edir və burada çoxsaylı hüceyrə fəaliyyətlərini blok edir (mane olur). İki belə dərman kolxisin və vinablastin hüceyrədə mikroborucuqların toplanmasını blok edir (Fəsil 18). MDR1 vasitəsilə belə dərmanların ATP ilə-təmin olunan eksportu sitozolda onların qatılığını azaldır. Nəticədə, ABCB1 ekspressiya edən hüceyrələri öldürmək üçün, onu ekspressiya etməyən hüceyrələrə nisbətən daha yüksək hüceyrəxarici dərman qatılığı tələb olunur. Təmizlənmiş zülala malik olan liposomlarla nümayiş etdirilmişdir ki, ABCB1 ATP ilə-işləyən kiçik-molekullu nasosdur. Müxtılif dərmanlar bu liposomların ATP-aza fəallığını dozadan-asılı olan şəkildə, onların ABCB1 ilə daşına bilmə qabliyyətinə uyğun olaraq gücləndirir.

ABCB1-in, onun bakteriyadakı homoloji ABC daşıyıcılarla birlikdə üç-ölçülü quruluşu onun daşıma mexanizmini, eləcə də geniş sırada hidrofil və hidrofob substratları birləşdirmək və daşımaq qabliyyətini aşkar etdi (Şəkil 11-15). İki T domeni membranın mərkəzində, daxilə (Şəkil 11-15b) və xaricə (Şəkil 11-15c) baxan istiqamətlərdə növbələşən birləşmə saytını əmələ gətirirlər. Zülalın bu iki konformasiya vəziyyəti arasındakı əvəzolunmalar ATP-nin iki A subvahidinə birləşməsi və ardınca da ADP və P_i-a hidrolizi ilə güclənir, amma bunun dəqiqliklə necə baş verdiyi məlum deyil.

ABCB1-in yaratdığı substrat-birləşdirən boşluq böyükdür. Boşluqda düzülən bəzi amin turşuları aromatik yan zəncirlərə malikdirlər, əsasən də tirozin və fenilalanin, ABCB1-in müxtəlif tipli hidrofob liqandlara birləşməsinə imkan verir. Boşluğun başqa seqmentləri hidrofil qalıqlardan təşkil olunmiuşdur, bu da hidrofil və amfipatik molekulların birləşməsinə imkan verir. Daxilə-baxan konformasiyada, birləışmə saytı birbaşa ətrafdakı su mühitinə açılır və hidrofil molekulların sitozoldan birbaşa birləşmə saytına keçməsinə imkan verir. Bundan əlavə, zülaldakı boşluq birbaşa membran ikiqatlısının daxili vərəqinin hidrofob özəyindən əldə ediləbiləndir, bu hidrofob molekulların daxili membran vərəqəsindən birbaşa birləşmə saytına daxil olmasına imkan verir (bax Şəkil 11-15b). ATP ilə-təmin olunma xaricə baxan konformasiyaya dəyişiləndə, molekullar birləşmə saytından çıxaraq eqzoplazmatik membran vərəqəsinə və ya birbaşa hüceyrəxarici mühitə keçə bilirlər (Şəkil 11-15c).

Məməlilərin, artıq 50-ə yaxın müxtəlif ABC nəqliyyat zülalları tapılmışdır (Cədvəl 11-3). Eukariot hüceyrələrdə ABC zülallar yalnız plazma membranında deyil, həmçinin bir çox hüceyrədaxili orqanoidlərin membranlarında da yerləşirlər. Onlardan bir neçəsi qaraciyərdə, bağırsaqlarda və böyrəkdə – təbii toksik və tullantı məhsullarının bədəndən uzaqlaşdırıldığı

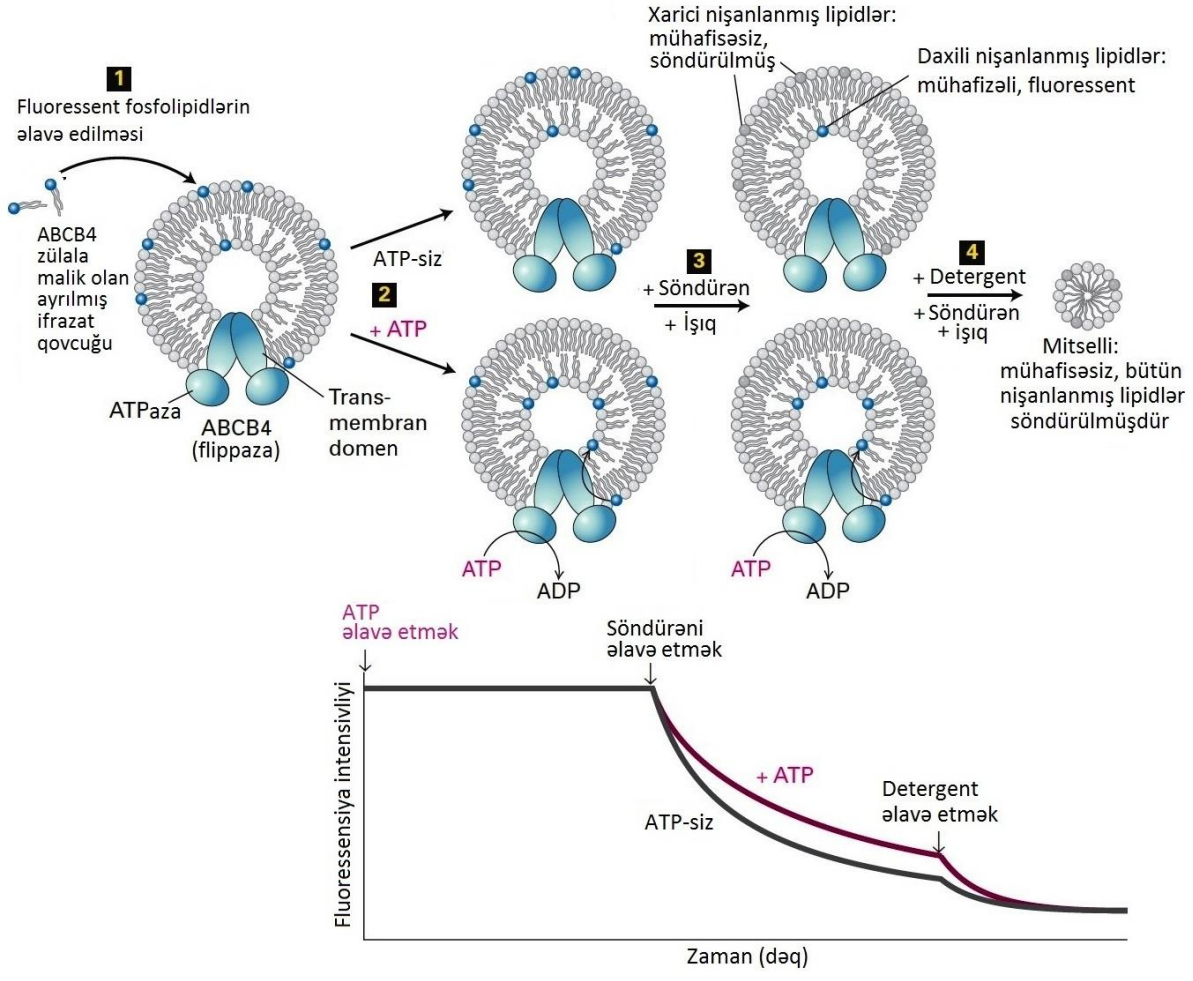


ŞƏKİL 11-15 Multidrag-transporter ABCB1 (MDR1): qyruluşu və liqand eksport modeli. (a) Dərman analoqu qz59-sss-in (qara) iki molekuluna birləşmiş ABCB1 zülalının ortasından keçən eninə kəsiyinin görünüşü liqand-birləşdirən saytın fosfolipid ikiqatlısı ilə nisbətdə mərkəzi yerini aşkar edir: mərkəzi liqand-birləşdirən boşluq membranın iki vərəqəsi arasındakı interfeysə yaxındır. Daşınma zamanı, bu birləşmə boşluğu ardıcıl olaraq membranın eqzoplazmatik və sitozol səthinə açıq vəziyyətdə olur. Serin 289 və 290 transporterin liqand spesifikliyinə təsir edir, onların birləşmiş liqanda yaxın yerləşməsini göstərmək üçün, onlar qırmızı şarlar kimi işarələnmişdirlər. Səth qalıqları hidrofob amin turşularını göstərmək üçün sarı rənglə, hidrofil amin turşularını isə göstərmək üçün mavi rənglə işarələnmişlər. (b) ABCB1-in daxildə sitozola baxan liqand-birləşdirən saytla üç-ölçülü quruluşu. Bu konformasiyada hidrofil liqand birbaşa sitozoldan birləşə bilir. Daha çox hidrofob olan liqand plazma membranın daxili vərəqələrinə bölünə bilir və sonra zülalda daxili vərəqənin hidrofob özəyinə birbaşa əlçatan olan deşikdən keçərək liqand birləşdirən sayta daxil ola bilir. (c) ABCB1-in liqand-birləşdirən saytla xaricə baxan quruluş modeli homoloji bakterial ABC zülallarıln quruluşuna əsaslanır. Zülal bu konformasiyanı alanda liqand ya eqzoplazmatik vərəqəyə diffuziya edir ya da birbaşa hüceyrəxarici su mühitinə daxil olur. Bax D. Gutmanb et al., 2009, *Trends Biochem.Sci*. **35**:36-42. [Verilənlər S.G. Aller et al., 2009, *Science* **323**:1718-1722 PDB ID 3g61.]

CƏDVƏL 11-3 İnsanın seçilmiş ABC zülalları

Zülal	Ekspresiya olunduğu toxuma	Fəaliyyəti	Qüsurlu zülalın səbəb olduğu xəstəlik
ABCB1, (MDR1)	Böyrəküstü vəz, böyrək, beyin	Lipofil dərmanları eksport edir	
ABCB4, (MDR2)	Qaraciyər	Fosfatidilxolini ödə daşıyır	
ABCB11	Qaraciyər	Öd duzlarını ödə eksport edir	
CFTR	Eqzokrin toxuma	Cl^- ionlarını eksport edir	Kistik fibroz
ABCDI	Peroksisomlarda geniş yayılıb	Çox uzun yağ turşularını oksidləşdirən peroksisom fermentlərinin fəallığına təsir edir	Adenoleykodistrofiya (ADL)
ABCG5/8	Qaraciyər, bağırsaq	Xolesterini və başa sterolları eksport edir	β-sitosterolemiya
ABCA1	Hər yerdə	Xolesterin və fosfolipidi yüksək-sıxlıqlı lipozülalların (HDL) daxilinə udulmaq üçün eksport edir	Tanqier xəstəliyi
ABCA4	Retina	*N*-retinal-fosfatidiletanolamini daşıyır	Fotoreseptor hüceyrələrində Starqardt xəstəliyi (yetkinlik yaşına çatmayan makular degenerasiya)

mərkəzlərdə zəngin şəkildə ekspressiya olunurlar. Bu ABC zülalların substratlarına şəkərlər, amin turşuları, xolesterin, öd turşuları, fosfolipidlər, peptidlər, zəhərli maddələr (toksinlər), və xarici (yad) maddələr daxildirlər. Çox guman ki, ABCB1-in normal fəaliyyəti, müxtəlif təbii və metabolik toksinlərin ifraz olunmaq üçün öd kisəsinə və ya bağırsaq lümenlərinə daşınması, ya da böyrəklərdə formalaşaraq sidiyə daşınmasıdır. Görünür ki, ABCB1 təkamülün gedişi ərzində quruluşu endogen toksinlərə çox oxşar olan dərmanları daşımaq qabliyyətini qazanmışdır. MDR-ekspressiya edən hüceyrə tiplərindən alınan, hepatomalar (qara ciyər xərçəngi) kimi şişlər tez-tez hallarda virtual olaraq bütün kemoterapevtik agentlərə qarşı müqavimətli (resistant) olurlar, ona görə də çətin müalicə olunurlar, çox guman ona görə ki, şişlər ABCB1 və ya ona yaxın olan ABC zülalını güclü şəkildə ekspressiya edirlər

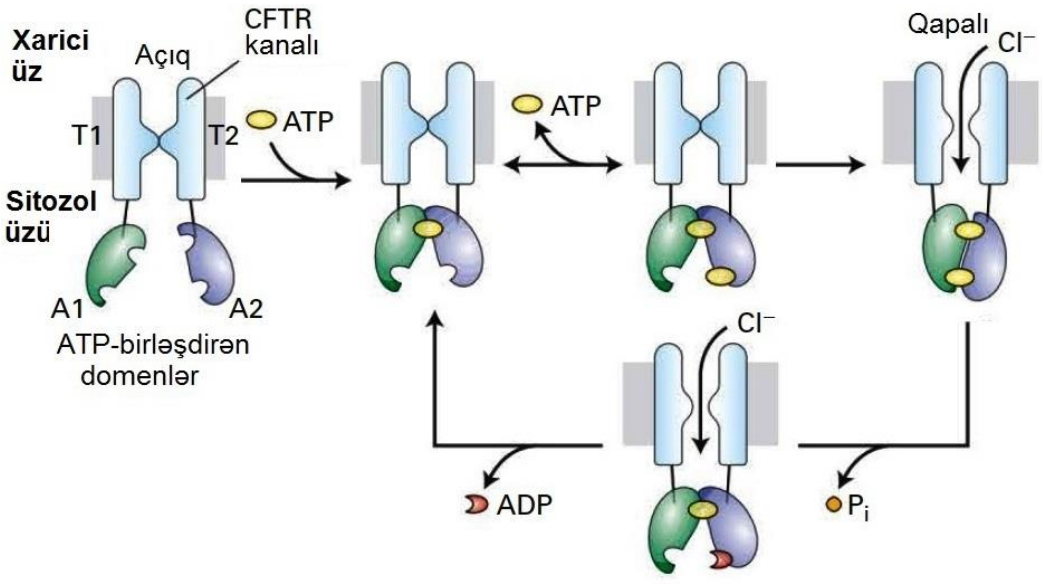


EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 11-16 In vitro fluoressensiya-sönmə sınağı ABCB4-ün fosfolipid fosfolipaza fəallığını aşkar edə bilir. ABCB4 zülalına malik olan ifrazat qovucuqlarının homogen populyasiyası məməlilərin ABCB4 zülalını kodlaşdıran DNT-nin temperatura-həssas maya *sec* mutantına keçirilməsi ilə elə alınmışdır ki, ABCB4 öz normal orientasiyasında hüceyrədaxili endoplazmatik şəbəkə (ER) qovucuqlarında yerləşmiş və qovucuqların sitozol üzü xaricə yönəlmişdir (bax Şəkil 14-4). Pillə 1: Fluoressent modifikasiya olunmuş baş qrupa (mavi) malik olan sintetik fosfolipidlər təmizlənmiş qovucuqları əhatə edən mühitə əlavə olunduqda, onlar ilkin olaraq təmizlənmiş qovucuqların xarici, sitozol vərəqəsinə birləşirlər. Pillə 2: Əgər ABCB4 flippaza kimi fəaliyyət göstərirsə, onda ATP-nin qovucuqların bayır tərəfinə əlavə olunması ilə bayıra-baxan nişanlanmış fosfolipidlərin kiçik fraksiyası daxili vərəqəyə çevriləcəkdir. Pillə 3: Çevrilmə, qovucuqları əhatə edən mühitə membran-keçirici olmayan, ditionit adlanan sönmə agentinin əlavə olunması ilə aşkar olunur. Detionit fluoressent baş qrupla reaksiyay girir, onun fluoressensiya qabliyyətini pozur (boz). Söndürücü (quencher) iştirak edəndə, yalnız nişanlanmış fosfolipidlər daxili vərəqədə qorunan mühitdə fluoressensiya edəcək. Söndürücü agent əlavə olunduqdan sonra ümumi fluoressensiya zamandan asılı olaraq xarici fluoressensiyanın söndüyü plato nöqtəsinə qədər azalır və yalnız daxili fosfolipid fluoressensiya aşkar oluna bilir. ATP mövcud olduqda onun olmamasından daha çox fluoressensiyanın (daha az sönmənin) müşahidə olunması göstərir ki, ABCB4 bəzi nişanlanmış fosfolipidləri daxili vərəqəyə çevirir. Burada göstərilməyənlər, ABCB4 ekspressiya etməyən hüceyrələrdən ayrılmış "nəzarət" qovucuqlardırlar və onlar flippaza fəallığı göstərmirlər. Pillə 4: Qovucuqlara detergentin əlavə olunması miselləri əmələ gətirir və bütün fluoressent lipidləri söndürücü agent üçün əlçatan edir, fluoressensiyanı ilkin qiymətinə qədər endirir. Bax S. Ruetz and P. Cros, 1994, Cell 77:1071.

Müəyyən ABC Zülallar Fosfolipidləri və Başqa Lipiddə-Həllolan Substratları Bir Membran Vərəqəsindən Digərinə "Atır"

Şəkil 11-15 (b) və (c) hissələridndə göstərildiyi kimi, ABCB1 hidrofob və ya amfipatik substrat molekulunu membranın daxili vərəqəsindən xarici vərəqəsinə keçirə və ya "ata" bilir. Bu energetik cəhətdən əlverişsiz reaksiya olub zülalın cütləşmiş ATP-aza fəallığı ilə gücləndirilir. ABCB1 ilə daşınmanın *Flippaza* adlandırılan bu modelinə dəstək qaraciyər-hüceyrəsinin plazma membranında olan və öd kanalcıqlarına baxan, ABCB1-ə homoloji olan ABCB4 (ilkin olaraq MDR2 kimi adlandırılıb) üzərində aparılan eksperimentlərdən gəlir. ABCB4 fosfatidilxolini sonda xolesterin və başqa ABC ailəsi nümayəndələri tərəfindən daşınan öd turşuları ilə birlikdə öd axarına buraxmaq üçün plazma membranın sitozol vərəqəsindən eqzoplazmatik vərəqəsinə keçirir. Bir sıra başqa ABC superailəsi nümayəndələri müxtəlif lipidlərin, yəqin ki, ABCB1-ə bənzər mexanizmlə hüceyrəyə daşınmasında iştirak edirlər (bax Cədvəl 11-3).

ABCB4-ün fosfolipaza fəallığının olması ilk olaraq şübhəli olmuşdur, çünki ABCB4 genində funksiyanın-itirilməsi mutasiyası olan homoziqot siçan fosfatidilxolinin ödə ifraz olunmasında qüsurları nümayiş etdirmişdir. Faktiki olaraq, ABCB4-ün flippaza olmasını birbaşa təyin etmək üçün tədqiqatçılar xüsusi maya hüceyrələrindən ayrılıb təmizlənmiş, membranında ABCB4-ə görə mutant olan və sitozol üzü xaricə istiqamətlənən qovucuqların homogen populyasiyası üzərində eksperimentləri apardılar (Şəkil 11-16). Bu qovucuqları təmizlədikdən sonra, tədqiqatçılar onları fluoressent fosfatidilxolin törəməsi ilə in vitro nişanladılar. Şəkil 11-16-da verilmiş Fluoressent-sönmə sınağından istifadə olunaraq göstərilmişdir ki, ABCB4-ə malik olan quvucuqlar ATP-dən-asılı olann flippaza fəallığını nümayiş etdirirlər.



ŞƏKİL 11-17 Kistik fibroz transmembran tənzimləyicinin (CFTR) quruluşu və fəliyyəti. ATP-nin kanalın açılmasını təmin edə bilməsindən oncə tənzimləyici (R) domen (göstərilmir) fosforlaşmalıdır. Fosforlaşan zaman bir ATP (sarı dairə) A1 domeninə (yaşıl) sıx şəkildə bağlanmış olur. İkinci ATP-nin A2 domeninə (mavi) birləşməsinin ardınca sıx molekuldaxili A1-A2 heterodimerin yaranması və kanalın zəif açılması baş verir. Nisbətən stabil olan açıq vəziyyətin stabilliyi A2 domenə birləşmiş ATP-nin ADP (qırmızı aypara) və Pi-a hidrolizi ilə pozulur. A1-A2 dimer interfeysinin davam edən pozulması kanalın bağlanmasına səbəb olur. T=transmembran domen; A=sitozol ATP-birləşdirən domen. Bax D.C. Gadsby et al., 2006, *Nature*, **440**:477.

ABC Kistik Fibroz Transmembran Tənzimləyici (CFTR) Nasos Deyil Xlorid Kanalıdır

İnsanın bir sıra genetik xəstəlikləri qüsurlu ABC zülallarla bağlıdır (bax Cədvəl 11-3). Bunlardan daha yxşı öyrəniləni və geniş yayılanı, *Kistik fibroz transmembran tənzimləyicini* (*CFTR*, *ABCC7*-də adlandırılır) kodlaşdıran gendə baş verən mutasiyanın səbəb olduğu Kistik fibrozdir (CF). Başqa ABC zülallar kimi CFTR iki transmembran T domeninə və iki sitozol A və ya ATP-birləşdirən domenlərə malikdir. SFTR sitozol üzündə əlavə R (tənzimləyici) domenə də malikdir, R domeni zülalın iki homoloji yarısımı əlaqələndirərək T1-A1-R-T2-A2 ümumi domen təşkilini yaradır. Amma, CFTR ion nasosu deyil Cl^- kanalıdır. O ağciyərdə epitel hüceyrələrinin, tər vəzilərinin, mədəaltı vəzin və başqa toxumaların apikal plazma membranlarında ekspressiya olunur. Məsələn, tərləməklə itirilmiş Cl^- ionlarını tər vəzilərin yenidən udması üçün CFTR zülal çox əhəmiyyətlidir, Kistik fibrozlu körpələr tez-tez duzlu şeyləri yalayırlar, çünki onlarda bu geriyəalma ingibirləşmişdir.

CFTR Cl^- kanalı normal halda bağlı olur. Kanalın açılması R domenin proteinkinaza (PKA, Fəsil 15-də müzakirə olunur) vasitəsilə fosforlaşması ilə fəallaşır, PKA isə öz növbəsində, hüceyrədaxili kiçik siqnal molekulu tsiklik-AMP-nin (cAMP) artması ilə fəallaşır. Kanalın açılması həmçinin iki ATP molekulunun ardıcıl olaraq A domenlərinə birləşməsini tələb edir (Şəkil 11-17).

Bütün CF xəstəliyi hallarının təxminən üçdə ikisi CFTR-də olan bir mutasiya ilə, ATP-birləşdirən A1 domenində 508-ci Phe qalığının itməsi ilə baş verir. Mutant zülal bədən temperaturunda düzgün bükülmür və normal fəaliyyət göstərdiyi hüceyrə səthinə gedə bilmir. Maraqlıdır ki, əgər mutant zülalı ekspressiya edən hüceyrələr otaq temperaturunda inkubasiya olunarsa zülal normal şəkildə onların fəaliyyət göstərdiyi plazma membranında təbii normal CFTR kanalı olan hüceyrələrdə olduğu kimi toplanır. Son zamanlar, CF xəstələrdəki CFTR mutant zülallara birləşərək onun 37 °C-də bükülmüş formasını stabilləşdirən, onun normal şəkildə hüceyrə səthinə hərəkətinə imkan yaradan və xəstəliyin təsirini qismən azaldan kiçik molekul kimyəvi yolla sintez olundu. Gly 551-i Asp-ə dəyişən başqa bir CFTR mutant, CF xəstəliyin təxminən 5 faizini təşkil edir, kanal zülalının normal səth ekspressiyası gedir, amma Cl^- nəqliyyatı qüsurlu olur, çünki mutasiya ATP birləşməsini qırır. Cl^- ionlarının mutant kanallardan axmasını artıran, CFTR potensiator adlanan kiçik molekullar xəstəliyin bu mutasiya nəticəsində yaranmış CF xəstələrində müalicəsində istifadə edilir. Bu dərmanlar xəstəliyin yaranmasına səbəb olan zülalın molekulyar anlayışına əsaslanan ilk uğurlu fərdi müalicələrinin bəzilərini təmsil edir.

11.3 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARRI

ATP ilə İşləyən Nasoslar və Hüceyrədaxili İon Mühiti

- Transmembran zülalların dörd sinifi: P-, V-, və F-sinif nasoslar və ABC zülalları, ATP-nin enerji ayrılan hidrolizini maddələrin öz qatılıq qradientlərinə qarşı enerji-tələb edən daşınması ilə birləşdirir (bax Şəkil 11-9).
- Plazma membranında P-sinif Na^+/K^+ ATP-azaların və plazma membranında və ya sarkoplazma şəbəkəsində homoloji Ca^{2+} ATP-azaların birgə fəaliyyəti heyvan hüceyrələrində adi ion mühitini yaradır: sitozolda yüksək K^+, aşağı Ca^{2+} və aşağı Na^+; hüceyrəxarici mayedə aşağı K^+, yüksək Ca^{2+} və yüksək Na^+ ionları.
- P-sinif nasoslarda α (katalitik) sibvahidin fosforlaşması və konformasiya vəziyyətlərinin dəyişilməsi H^+, Na^+, K^+, və ya Ca^{2+} ionlarının daşınmasının ATP hidrolizi ilə birləşməsi üçün çox vacibdir (bax Şəkillər 11-10-dan 11-13-ə qədər).
- Yalnız protonların daşınmasını həyata keçirən V- və F-sinif ATP-azalar, transmembran domendə proton-keçirən kanalı və sitozol domendə ATP-birləşdirən saytları olan böyük çoxsubvahidli komplekslərdir.
- Heyvanların lizosom və endosom membranlarında və bitki vakuol membranında V-sinif H^+ nasosları orqanoidlərin daxilində onların əhatə olunduqları sitozola nisbətən aşağı pH-ın saxlanılmasını təşkil edirlər (bax Şəkil 11-14).
- Nəqliyyat zülallarının böyük və çox-müxtəlifli ABC superailəsinin nümayəndələri dörd əsas domenə: məhlulların keçməsi üçün keçid yolunu əmələ gətirən və substrat spesifikliyini təyin edən iki transmembran domenə və ATP-birləşdirən iki sitozol domeninə malikdirlər (bax Şəkil 11-15).
- Çox dərman daşıyıcısı (multdrug transporter) ABCB1-in iki T domeni membran müstəvisinin ortasında liqand-birləşdirən mərkəzi əmələ gətirir. Liqandlar birbaşa sitozoldan və ya daxili membran vərəqəsindən zülaldakı boşluq (gap) vasitəsi ilə birləşə bilir.
- ABC superailəsinə, toksinlər, dərmanlar, fosfolipidlər, peptidlər, və zülallar kimi geniş sırada substratları hüceyrənin daxilinə və ya xaricinə daşıyan, məməlilərin 50-ə yaxın zülalları (məsələn, ABCB1, ABCA1) daxildirlər.
- Biokimyəvi eksperimentlər birbaşa nümayiş etdirirlər ki, ABCB4 (MDR2) fosfolipid flippaza fəallığına malikdir (bax Şəkil 11-16).
- ABC zülalı CFTR, ion nasosu deyil, o Cl^- kanalıdır. Kanalın açılmasına zülalın fosforlaşması və ATP-nin iki A domenlərinə birləşməsi səbəb olur (bax Şəkil 11-17).

11.4 Qapanmayan İon Kanalları və Sakitləşən Membran Potensialı

İonları onların qatılıq qradientinə *qarşı* daşıyan ATP-ilə-işləyən ion kanallarından başqa, plazma membranı kanal zülallarına da malikdir, bunlar hüceyrənin əsas ionlarının (Na^+, K^+, Ca^{2+} və Cl^-) bu kanllardan keçərək müxtəlif sürətlə qatılıq qradientlərinin *aşağıya azalan* istiqamətində hərəkətinə imkan verirlər. Nasoslarla və ionların kanallarla selektiv hərəkəti nəticəsində yaranan ion qatılığı qradientləri, plazma membranınıda yaranan gərginlik və ya elektik potensialı fərqinin yaranmasının əsas mexanizmini təşkil edir. Başqa sözlə, ATP-ilə-işləyən ion nasosları plazma membranı tərəflərində ion qatılıqlarının fərqlərini yaradır və ion kanalları bu qatılıq qradientlərini sıx nəzarət olunan membran elektrik potensialını yaratmaq üçün istifadə edirlər (bax Şəkil 11-3).

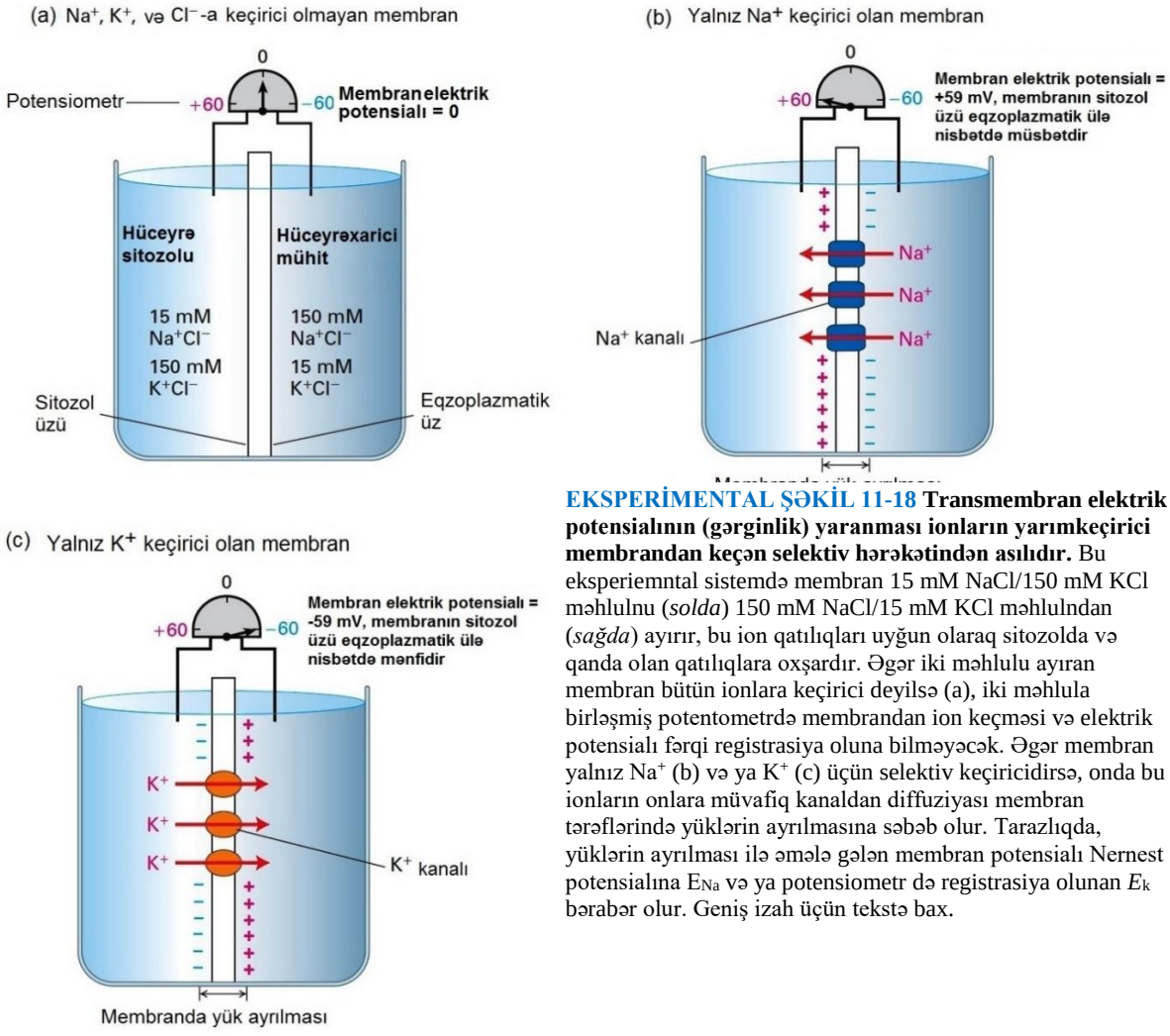
Bütün hüceyrələrdə, ümumiyyətlə elektrik potensialının qiyməti ~70 millivoltdur (mV), *daxildə* hüceyrə membranının sitozol üzündə eqzoplazmatik üzə nisbətən həmişə *mənfi* olur. İlk baxışda bu qiymət çox da böyük görünmür, amma biz hesab edək ki, plazma membranının qalınlığı yalnbız ~3.5 nm-dir. Belə olan halda, plazma membrandan keçən gərginlik qradienti hər 3.5×10^{-7} sm-də 0.07 V-dur və ya hər santimetr üçün 200000 V edir. (Bunun nə qədər olduğunu qiymətləndirmək üçün hesab et ki, yüksək voltajlı elektriki ötürən xətlər hər kilometrə 200000 voltluq qradienti istifadə edir, 10^5 dəfə az!)

Plazma membrandan keçən ion qradientləri və elektrik potensialı çoxsaylı bioloji proseslərdə mühüm rol oynayır. Əvəllər qeyd olunduğu kimi, sitozolda Ca^{2+} qatılığının artması, əzələ hüceyrələrinin dartılmasını inisiasiya edən və çox hüceyrələrdə mədəaltı vəzin həzm fermentləri kimi zülallarının ifrazına səbəb olan çox əhəmiyyətli tənzimləyici siqnaldır. Çox heyvan hüceyrələrində Na^+ qatılıq qradientinin və membran elektrik potensialının birləşmiş gücü simporter və antiporter zülallar vasitəsilə amin turşularının və başqa molekulların onlarınn qatılıq qradientlərinə qarşı udulmasını aparır (bax Şəkil 11-3 və Bölmə 11.5). Bundan başqa, neyronloarla elektrik siqnalının verilməsi membranın elektrik potensialındakı dəyişilmələrə cavab olaraq ion kanallarının açılmasından və bağlanmasından asılıdır (Fəsilb 22).

Biz burada, sakitlikdə olan qeyri-neyron hüceyrələrində membranın (çox hallarda hüceyrənin "*sakitlikdə olan membran portensialı*" adlanan) elektrik potensialının mənşəyini, ion kanallarının ionların membrandan keçən selektiv hərəkətini necə həyata keçirdiyini, kanal zülallarının funksional xassələrini səciyyələndirən çox səmərəli eksperimental metodları müzakirə edirik.

İonların Selektiv Hərəkəti Transmembran Elektrik Potensialını Yaradır

Elektrik potensialının plazma membranında necə yarandığını izah etmək üçün, biz əvvəlcə membranın onun sağ tərəfində olan 150 mM NaCl/15 mM KCl məhlulunu (metazoan hüceyrələrini əhatə edən hüceyrəxarici mühitdə olduğuna bənzər olaraq), sol tərəfində olan 15 mM NaCl/150 mM KCl məhlulundan (sitozoldakıbna bənzər olan) necə ayırdığı sadələşdirilmiş eksperimental sistemlər dəstinə baxırıq (Şəkil 11-18a). Membran tərəflərində elektrik potensiallarının fərqini ölçmək üçün potensiometr (voltmetr) hər iki məhlula birləşdirilmişdir. Əgər membran bütün ionlar üçün qeyri keçiricidirsə ondan heç bir ion keçməyəcək. Əvvəlcə hər iki məhlul bərabər sayda müsbət və mənfi ionlara malik olacaqdır. Bundan əlavə, Şəkil 11-18a-da göstərildiyi kimi, membran tərəflərində gərginlikdə və ya elektrik potensialı gradientində fərq olmayacaqdır.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 11-18 Transmembran elektrik potensialının (gərginlik) yaranması ionların yarımkeçirici membrandan keçən selektiv hərəkətindən asılıdır. Bu eksperiemntal sistemdə membran 15 mM NaCl/150 mM KCl məhlulnu (*solda*) 150 mM NaCl/15 mM KCl məhlulndan (*sağda*) ayırır, bu ion qatılıqları uyğun olaraq sitozolda və qanda olan qatılıqlara oxşardır. Əgər iki məhlulu ayıran membran bütün ionlara keçirici deyilsə (a), iki məhlula birləşmiş potentometrdə membrandan ion keçməsi və elektrik potensialı fərqi registrasiya oluna bilməyəcək. Əgər membran yalnız Na^+ (b) və ya K^+ (c) üçün selektiv keçiricidirsə, onda bu ionların onlara müvafiq kanaldan diffuziyası membran tərəflərində yüklərin ayrılmasına səbəb olur. Tarazlıqda, yüklərin ayrılması ilə əmələ gələn membran potensialı Nernest potensialına E_{Na} və ya potensiometr də registrasiya olunan E_k bərabər olur. Geniş izah üçün tekstə bax.

İndi fərz edək ki, membran Na^+ ionlarını buraxan, amma K^+ və Cl^- ionlarını buraxmayan Na^+-kanalı zülallarına malikdir (Şəkil 11-18b). Onda Na^+ ionları qatılıq qradientinin azalan istiqamətində aşağıya, sağdan sola doğru hərəkətə meyilli olacaq və sağda Na^+ ionlarına nisbətən mənfi yüklü Cl^- ionlarının çoxluğu yaranacaq, sol tərəfdə isə Cl^- ionlarına nisbətən müsbət yükülü Na^+ ionlatının çoxluğu yaranacaq. Na^+ çoxluğu sol tərəfdə və Cl^- çoxluğu sağ tərəfdə membranın müvafiq səthlərinə yaxın yerdə olur, çünki membranın bir tərəfindəki müsbət yüklərin çoxluğu digər tərəfindəki mənfi yüklərlə cəzb olunur. Nəticədə yüklərin membran tərəflərində əmələ gələn ayrılması, membranın sol (sitozol) tərəfində sağ tərəfinə nisbətən müsbət yüklərin çoxluğu ilə elektrik potensialını və ya gərginliyini tyaradır.

Konvensiyaya görə potensial membranın *sitozol* üzünün *eqzoplazmatik* üzünə nisbəti ilə ifadə olunur və bərabərlik ionun Əgər membran yalnız Na^+ ionlarına keçiricidirsə, o zaman tarazlıqda ölçülən membran elektrik potensialı voltlarla natrium tarazlıq potensialına, E_{Na} bərabərdir. E_{Na} qiyməti fiziki kimyanın əsas prinsiplərindən alınan *Nernst bərabərliyi* (*tənliyi*) ilə verilir:

$$E_{Na} = \frac{RT}{ZF} ln \frac{[Na_{sağ}]}{[Na_{sol}]} \qquad (11\text{-}2)$$

burada R (qaz konstantı) = 1.987 cal/(dərəcə·mol), və ya 8.28 joul/(dərəcə·mol); 20ºC-də, T (absolyut temperatur dərəcə Kelvinlə) = 293 ºK; Z (yük, valentlik də adlanır) burada +1-ə bərabərdir; F (Faradey konstantı) = 23062 cal/(mol·V), və ya 96000 kulon/(mol·V) və $[Na_{sol}]$ və $[Na_{sağ}]$ tarazlıqda uyğun olaraq sol və sağ tərəflərdə Na^+ ionlarının qatılığıdır hüceyrəxarici məhluldakı qatılığını (burada membranın sağ tərəfi) surətdə yerləşdirməklə və sitozol qatılığını məxrəcdə yerləşdirməklə yazılır.

20ºC-də (otaq temperaturu) 11-2 bərabərliyi azalaraq:

$$E_{Na} = 0.059\ log_{10} \frac{[Na_{sağ}]}{[Na_{sol}]} \qquad (11\text{-}3)$$

olur. Əgər $[Na_{sağ}]/[Na_{sol}]$ = 10 olarsa, Şəkil 11-18d-dəki kimi nisbət qatılıqdan on dəfə artıqdırsa, onda eqzoplazmatik sağ tərəflə nisbətdə sol tərəf, sitoplazmatik tərəf müsbət olmaqla E_{Na} = +0.059 V (və ya +59 mV).

Əgər membran, Na+ və Cl^- ionlarına deyil, yalnız K^+ ionlarına keçiricidirsə, onda oxşar bərabərlik kaliumun tarazlıq potensialı E_K-u təsvir edəcək:

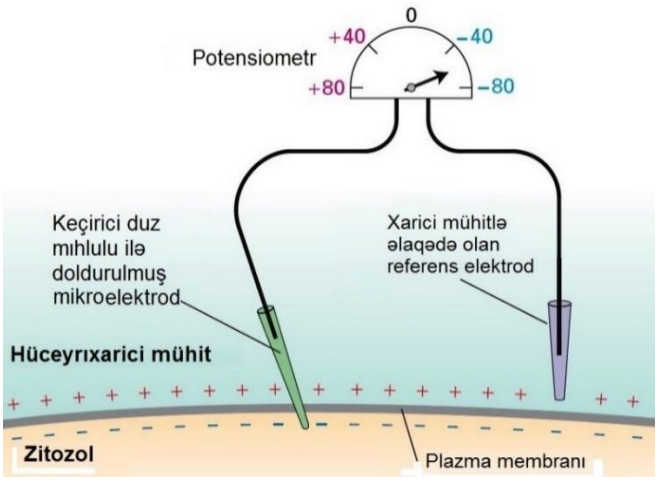
$$E_K = 0.059\ log_{10} \frac{[K_{sağ}]}{[K_{sol}]} (11\text{-}4)$$

Membran elektrik potensialının *qiyməti*, sol tərəfdəki müstəsna olmaqla eynidir (ion qatılıqlarındakı onqat fərq ilə 59 mV), amma sol, sitozol üzündə sağ tərəflə, eqzoplazmatik üzlə nisbətdə mənfidir (Şəkil 11-18c), ona görə də polyarlıq indi Na^+ ionlarına selektiv keçirici olan membranda alınan polyarlığa qarşı ziddir.

Heyvan Heceyrələrində Sakit Membran Potensialı Əsasən K^+ İonlarının Açıq K^+ Kanalları ilə Xaricə Axmasından Asılıdır

Heyvan hüceyrələrinin plazma membranları çoxsaylı açıq K^+ kanallarına, amma çox az sayda açıq Na^+, Cl^- və ya Ca^{2+} kanallarına malikdirlər. Nəticədə, plazma membranından keçən əsas ion hərəkəti K^+ ionlarının K^+ qatılıq qradientləri ilə işləyən *daxildən xaricə* keçməsidir. Bu keçmə Şəkil 11-18c-də göstərilən eksperimental sistem kimi, *mənfi yükün* artıq hissəsini plazma membranın sitozol üzündə buraxır, eqzoplazmatik üzdə isə *müsbət yükün* çoxluğunu yaradır. K^+ ionlarının belə xaricə axması daxili-mənfi membran potensialının əsas təyinedicisidir. K^+ ionlarının axdığı **sakitlikdə oan K^+ kanalları** adlanan bu kanallar bütün başqa kanallar kimi açıq və qapalı vəziyyətlər arasında növbələşir (bax Şəkil 11-2), amma onların açılmasına və qapanmasına membran potensialı və ya kiçik molekullar təsir etmədiyindən bu kanallar *qapanmayan* (*non-gated*) kanallar adlanır. Əksinə, müxtülif qapanan kanallar neyronlarda və başqa həyacanlanan hüceyrələrdə (Fəsil 22) yalnız spesifik liqandlara və ya membran potensialındakı dəyişilmələrə cavab olaraq açılırlar.

–60-dan –70 mV-a qədər olan, adi sakitlikdəki membran potensialı miqdarca Nernest tənliyindən və hüceyrələrdəki və onları əhatə edən mühitdəki K^+ qatılıqlarından hesablanmış kalium tarazlıq potensialına çox yaxınıdır (bax Cədvəl 11-2). Adətən az sayda Na^+ kanalları açıq olduğundan sakitlikdə olan membran potensialı Nernest bərabərliyi ilə hesablananlardan aşağı (az mənfi) olur. Bu kanallar Na^+ ionlarının xalis *daxilə* axınına imkan verir, membranın sitozol üzünü daha çox müsbət edir, bu Nernest bərabərliyi ilə əvvəlcədən K^+ üçün hesablananlardan daha az mənfi olur. İonların sakitlikdə olan K^+ kanalından axmasını idarə edən K^+ qatılıq qradienti əvvəllər təsvir olunmuş Na^+/K^+ ATP-aza vasitəsi ilə yaradılır (bax Şəkillər 11-3 və 11-13). Bu nasos olmadıqda, və ya o ingibirləşəndə K^+ qatılıq qradienti saxlanıla bilmir, membran potensialının qiyməti sıfıra enir və sonda hüceyrə ölür.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 11-19 Canlı hüceyrələrin plazma membranında elektrik potensialı ölçülə bilər. Həddən artıq kiçik diametrdə olan şüşə borucuqları KCl məhlulu kimi keçirici maye ilə doldurmaqla yaradılan mikro elektrod hüceyrə daxilinə elə keçirilir ki, səth membranı özünü elektrodun yuxarı hissəsi ətrafında bağlayır. Müqayisə elektrodudu yuma mühüitində yerləşdirilir. Elektrodlara birləşən potensiometr potensialı qeyd edir, bu halda –60 mV olub membranın eqzoplazmatik üzü ilə nisbətdə sitoozol üzü mənfidir. Potensial fərqi yalnız mikroelektrodlar hüceyrəyə keçirilən zaman qeyd olunmuşdur, yuma mühüitində yerləşdirilmiş elektrodda isə qeyd olunmamışdır.

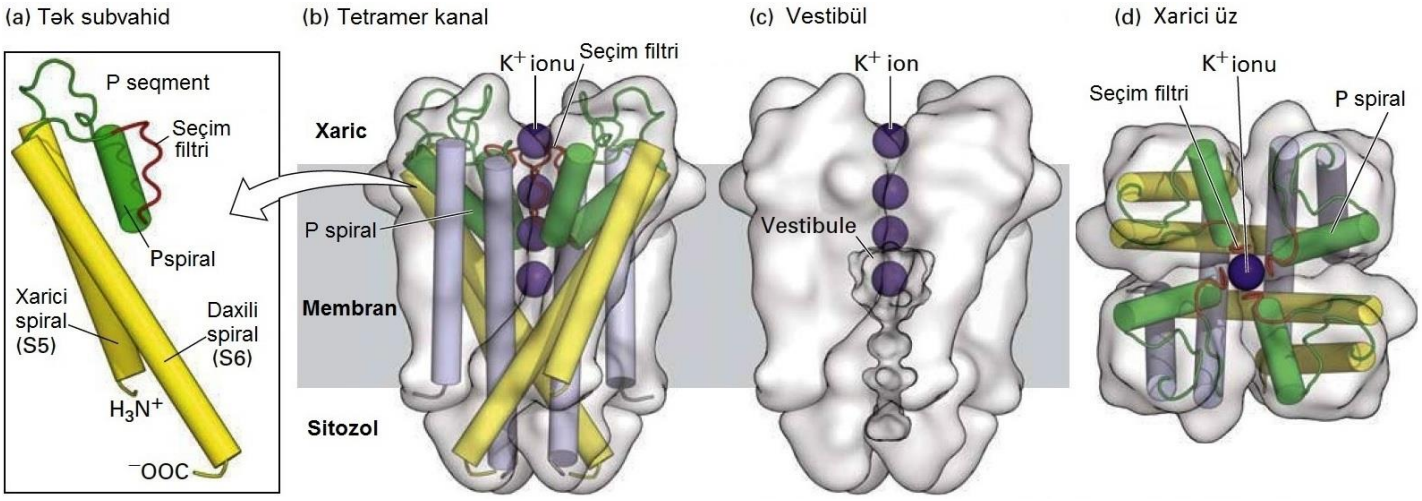
Sakitlikdə olan K^+ kanalları heyvan hüceyrələrinin plazma membranında elektrik potensialının yaranmasında dominant rol oynasa da, bu bitkilərdə, bakteriyalarda, göbələk hüceyrələrində belə deyildir. Bitki və göbələk hüceyrələrində daxili-mənfi membran potensialı müsbət yüklənmiş protonların (H^+) hüceyrədən ATP-ilə-işləyən proton nasosu vasitəsilə kənara daşınması ilə yaranır, bu proses lizosomal membranlarda Cl^- kanalları olmayan halda baş verənlərə bənzəyir (bax Şəkil 11-14a): hər bir H^+ nasosla hüceyrədən xaricə vurularaq özündən arxada Cl^- ionlarını saxlayır və membranın tərəflərində (sitozol üzü mənfi olan) elektrik potensialı qradientini yaradır. Aerob bakteriyal hüceyrələrdə daxili mənfi potensial, elektron daşınması zamanı protonların bayıra vurulması ilə yaradılır, bu proses mitoxondrilərin daxili membranlarında proton vurulmasına bənzəyir və Fəsil 12-də ətraflı şəkildə müzakirə olunacaq (bax Şəkil 12-22).

Hüceyrələrin plazma membranı tərəflərindəki potensial hüceyrə daxilinə keçirilmiş mikroelektrodlarla və hüceyrəxarici mayeyə keçirilmiş müqayisə elektrodları ilə ölçülə bilər. Bu iki elektrod, kiçik potensial fərqləri ölçə bilən potensiometrə birləşdirilir (Şəkil 11-19). Heyvan hüceyrələrinin çoxunda plazma membranı tərəflərində potensial əsasən zamana görə dəyişilmir. Əksinə, neyronlar və əzələ hüceyrələri – elektrik cəhətdən fəal hüceyrələrin əsas tipləri – bizim Fəsil 22-də müzakirə edəcəyimiz kimi, öz membran potensiallarında nəzarət olunan dəyişikliyə uğrayırlar.

İon Kanalları Molekulyar "Selektivlik Filtiri" Yolu ilə Bəzi İonlar üçün Selektiv Olur

Bütün ion kanalları xüsusi bir ion üçün spesifklik nümayiş etdirirlər: K^+ kanalı K^+ ionlarının daxil olmasına imkan verir, amma Na^+ ionlarının daxil olmasina elə də yaxından təsir etmir, eləcə də Na^+ kanalları Na^+ ionlarını tanıyır, amma K^+ tanımır. Bakteriyaların K^+ kanalının üç-ölçülü quruluşunun təyini ilk dəfə bu incə ion seçiciliyinə necə nail olunmasını aşkar etdi. Bakteriyalar, göbələklər və insan kimi geniş müxtəlifliyə malik olan orqanizmlərin başqa K^+ kanallarının quruluşlarının və ardıcıllıqlarının müqayisəsi aşkar etdi ki, bütün bunların hamısı ümumi oxşar quruluşa malikdirlər və yəqin ki, təkamülcə bir tip kanal zülalından törəmişlər.

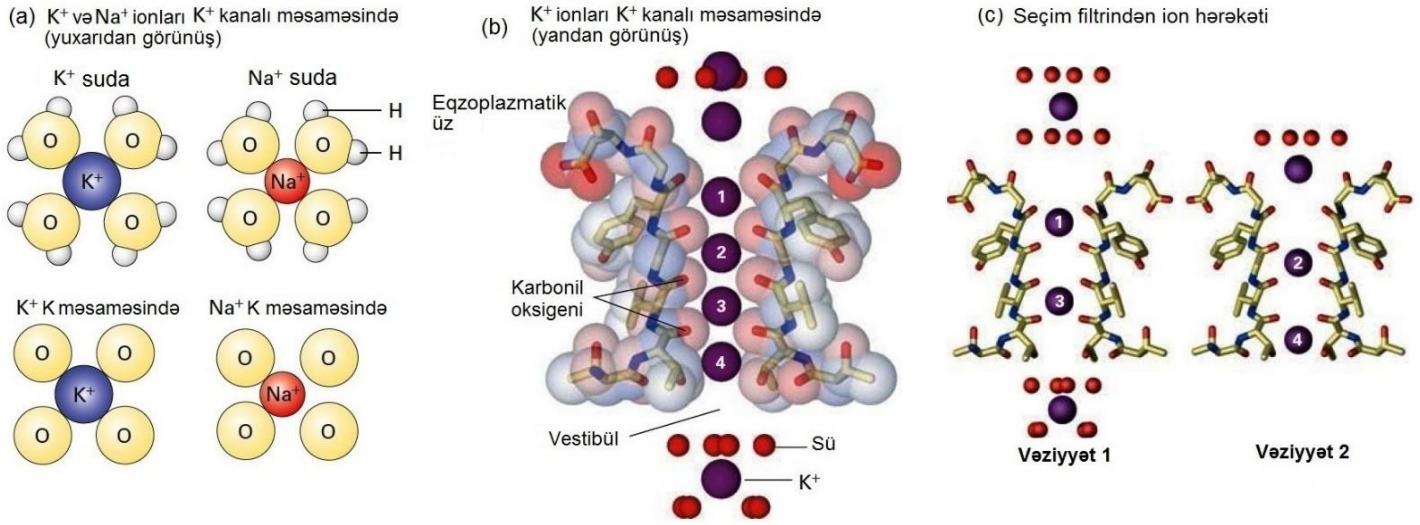
Bütün başqa K^+ kanalları kimi bakterial K^+ kanalları da, mərkəzi məsamə ətrafında simmetrik düzülmüş dörd eyni transmembran subvahiddən təşkil olunmuşlar (Şəkil 11-20). Hər bir subvahid iki-membrana-sarınan α spirala (S5 və S6) və eqzoplazmatik səthdən membran ikiqatlısının içərisinə qismən uzanan qısa P (pore-məsamə) seqmentinə malikdir. Tetramer K^+ kanalında, səkkiz trans-membran α spiral (hər subvahiddə iki), kanalın mərkəzi hissəsində, membrandan sitozola tərəf yarım yol uzanan *dəhliz* (*vestibül*) adlanan su ilə-doldurulmuş boşluğu əmələ gətirərək tərs çevrilmiş konusu yaradırlar. Dörd P seqmentin hissələri olan dörd uzanan ilgək məsamənin dar hissəsində, eqzoplazmatik səthə yaxın, dəhlizdən (vestibüldən) yuxarda aktual *ion-seçimi-filtrini* əmələ gətirir.



ŞƏKİL 11-20 *Steptomyces lividans* bakteriasının sakitlikdə olan K^+ kanalının quruluşu. Bütün K^+ kanalı zülalları hər biri, konvensiyaya görə S5 və S6 kimi adlanan iki konservativ membrana-sarınan α spirala və qısa P və ya məsamə seqmentinə malik olan dörd identik subvahiddən təşkil olunmuş tetramerlərdirlər. (a) Subvahidlərdən biri yandan əsas quruluş xüsusiyyətləri ilə göstərilir. (b-d) Tam tetramer kanalın yandan (b və c) və yuxarıdan və ya hüceyrəxarici ucdan (d) görünüşü. P seqmentlər (yaşıl) eqzoplazmatik səthə yaxın yerləşir və S5 və S6 α spiralları [(a)-da sarı və (b-d)-də sarı və lavenda] birləşdirir, onlar məsamənin yuxarı hissəsində düzülən qeyri-spiral "qüllə"dən təşkil olunmuşlar; qısa α spiral və uzanan ilgək məsamənin dar hissəsinə dik çıxaraq ion selektivlik filtrini yaradırlar. Bu filtr K^+ ionlarının (bənövşəyi kürələr) keçməsinə imkan verir, amma başqa ionları buraxmır. Filtrdən aşağıda, daxili və ya S6 α spiralların düzüldüyü mərkəzi boşluq və ya dəhliz (vestubül) yerləşir. Qapanan K^+ kanallarında, spesifik stimullara cavab olaraq açılan və qapanan subvahidlər, burada göstərilməyən əlavə transmembran spirallara malik olurlar, bunlar Fəsil 22-də müzakirə olunur. [Verilənlər Y. Zhou et al., 2001, *Nature* **414**:43, PDB ID 1k3c.]

Bir sıra yaxın sübutlar ion seçilməsində P seqmentlərin rolunun təsdiqləyir. Birincisi, P seqmentin aminturşu ardıcıllığı bütün məlum olan K^+ kanallarında homolojidir və başqa ion kanallarında olan ardıcıllıqlardan fərqlənirlər. İkincisi, bu seqmentlərdə müəyyən amin turşularının mutasiyası Na^+ ionlarını K^+ ionlarından fərqləndirmək qabliyyətini dəyişir. Nəhayət üçüncüsü, bakterial K^+ kanalında P seqmentin məməlilərin K^+ kanalının homoloji seqmenti ilə əvəz olunması başqa ionlara nisbətən K^+ ionlarına normal selektivlik göstərən ximer zülalın alınması ilə nəticələnir. Beləliklə, guman olunur ki, bütün K^+ kanalları K^+ ionlarını başqalarından fərqləndirmək üçün eyni mexanizmdən istifadə edirlər.

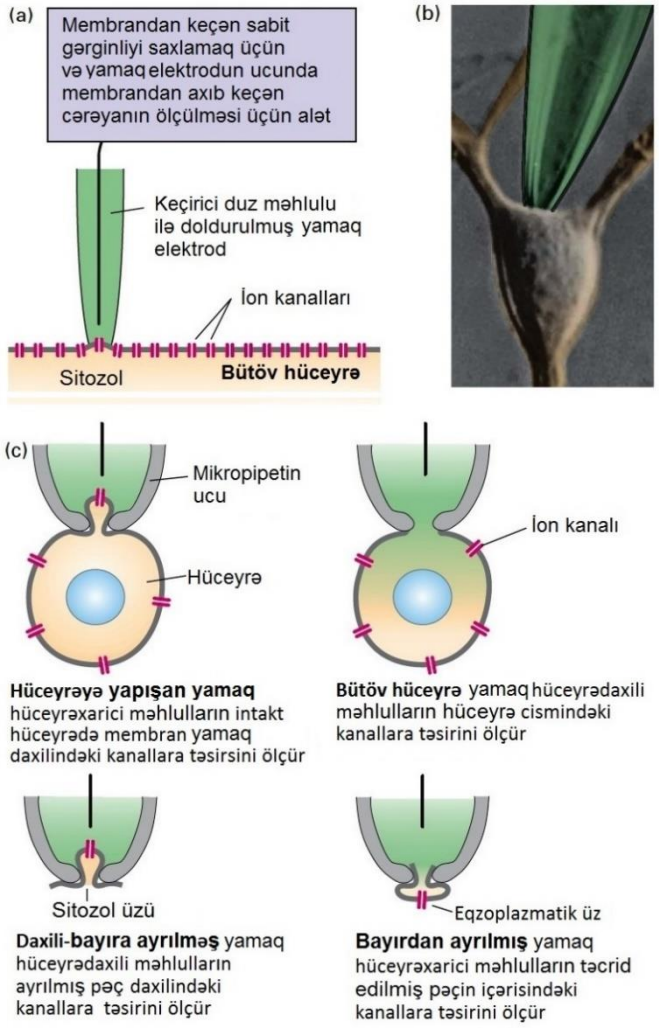
Na^+ ionları K^+ ionlarına nisbətən kiçikdir. Onda necə olur ki, kanal zülalları daha kiçik olan Na^+ ionlarını keçirmədən K^+ ionlarını keçirə bilirlər? K^+ kanalında ion-selektivliyi filtrinin K^+ ionlarını Na^+ ionlarından ayırıb seçə bilməsi qabliyyəti əsasən Gly-Tyr-Gly ardıcıllığında yerləşən qalıqların özül karbonil oksigenlərinə görədir, bunlar hər bir məlum olan K^+ kanallarının P seqmentinin anoloji mövqeyində tapılmışdır. K^+ ionları dar selektivlik filtrinə – dörd qonşu (bitişik) subvahidlər tərəfindən yaradılan P seqment filtr ardıcıllıqları arasındakı sahəyə daxil olan kimi, özünün səkkiz hidratasiya suyunu itirir, amma eyni geometriyada, kanalın içərisini astar kimi örtən dörd P seqmentin hər birindən uzanmış ilgəklərin ikisində olan səkgiz özül karbpnil oksigeninə bağlanmış olur (Şəkil 11-21a, *aşağıda solda*). Beləliklə K^+ hidratasiyasından səkkiz suyu ayırmaq üçün kiçik enerji tələb edilir və nəticədə, su məhlulundan K^+ ionunun kanalın içərisinə keçməsi üçün nisbətən aşağı fəallaşma enerjisi tələb olunur. Dehidratasiya olunmuş Na^+ ionları, su məhlulunda Na^+ ionlarının normal səkkiz su molekulları ilə əhatə olunduğu eyni geometriya ilə selektivlik filtrini örtən bütün səkkiz karbonil oksigenlərinə birləşməsi üçün çox kiçikdir. Nəticədə, Na^+ ionları selektivlik filtrinə keçməkdənsə suda qalmağı daha üstün tuturlar, beləliklə Na^+ ionlarının knala daxil olması üçün sərbəst enerji nisbətən yüksək olur (Şəkil 11-21a, *sağda*). Sərbəst enerjidəki bu fərq K^+ ionlarının kanaldan Na^+ ionlarına nisbətən 1000 dəfə artıq keçməsinə imkan verir. Na^+ kimi, dehidratasiya olunmuş Ca^{2+} ionu da dehidratasiya olunmuş K^+ ionundan kiçik olur və selektivlik filtrində oksigen atomları ilə lazımlı qaydada qarşılıqlı əlaqə yarada bilmir. Həmçinin ona görə ki, Ca^{2+} ionu iki müsbət yükə malikdir və su oksigeninə bir yüklü Na^+ və K^+ ionlarına nisbətən daha sıx birləşir, ona görə də dehidratasiya suyunu Ca^{2+} ionlarından ayırmaq üçün Na^+ və K^+ ionlarına nisbətən daha çox enerji tələb olunur.



ŞƏKİL 11-21 Sakitlikdə olan K^+ kanallarında ion selektivliyi və daşınması mexanizmi. (a) Məhlulda və K^+ kanalı məsaməsində hidratasiya olunmuş Na^+ və K^+ ionlarının sxematik diaqramları. K^+ ionları selektivlik filtrindən keçdikdə onlar özlərinə birləşmiş su molekullarını itirirlər və əzəzində hər bir P seqmentin selektivlik filtr ilgəyində kanalın daxili-örtüyünü təşkil edən konservativ amin turşusu ardıcıllığının bir hissəsi olan səkkiz özül karbonil oksigenlərinə birləşmiş olurlar (onlardan dördü göstərilir). Daha sıx su molekulları örtüyünə malik olan daha kiçik Na^+ ionları mükəmməl şəkildə kanal oksigeni atomları ilə birləşə bilmirlər, ona görə də seyrək hallarda kanalı keçib gedə bilirlər. (b) Rentgen-kristalloqrafiya ilə alınmış yüksək-rezolyusiyalı elektron sıxlığı xəritəsi göstərir ki, K^+ ionları (bənövşəyi kürələr) selektivlik-filtrini kəsib keçirlər. Yalnız əks diaqnalda yerləşən iki kanal subvahidi göstərilir. Selektivlik filtri daxilndə hər bir hidratasiya olunmamış K^+ ionları kanalın daxilini örtən səkkiz karbonil oksigen atomları ilə (qırmızı çubuqlar) əlaqəyə girirlər, hər dörd subvahiddən ikisi sanki səkkiz hidratasiya suyunu təqlid edir. (c) Elektron sıxlığı xəritəsinin interpretasiyası K^+ ionlarının kanalla hərəkətinin iki alternativ vəziyyətini göstərir. İonların mövqeyi kanalın eqzoplazmatik tərəfdən içəriyə istiqamətdə yuxarıdan-aşağıya nömrələnmişdir. 1 vəziyyətində hidratasiya olunmuş K^+ ionunu onun birləşdiyi səkkiz su molekulu ilə, 1 və 3 vəziyyətlərində K^+ ionlarını selektivlik filtri daxilində, tam hidratasiya olunmuş K^+ ionlarını isə dəhliz (vestibül) daxilində görmək olur. K^+ hərəkəti zamanı, 1 vəziyyətində hər bir ion bir pillə içəriyə doğru hərəkət edir və 2 vəziyyətini əmələ gətirir. Beləliklə, K^+ ionu 2 vəziyyətində kanalın eqzoplazmatik tərəfində öz səkkiz suyundan dördünü itirir, ion 1 vəziyyətində 1 mövqeindən 2 mövqeyinə keçir, ion 1 vəziyyətinin 3 mövqeyindən isə 4 mövqeyinə keçir. 2 vəziyyətindən 1 vəziyyətinə keçərkən, K^+ ionu 4 mövqeyindən dəhlizə (vestibül) keçir və səkkiz su molekulunu götürür, eyni zamanda başqa bir hidratasiya olunmuş K^+ ionu açılan kanala daxil olur, digər K^+ ionları isə bir pillə aşağıya hərəkət edir. Qeyd edək ki, burada göstərilən K^+ ionları kanalın eqzoplazmatik tərəfindən sitozol tərəfinə hərəkət edir, çünki bu bakteriyalarda hərəkətin normal istiqamətidir. Heyvan hüceyrələrində isə K^+ hərəkətinin istiqaməti adətən əksinə, içəridən bayıra doğru olur. Bax C.Armstrong, 1998, *Science* **280**:56. [(b) və (c) hissələri Y. Zhou et al., 2001, *Nature* **414**:43, PDB ID 1k4c.]

Son zamanların rentgen-kristalloqrafiya analizləri aşkar etdi ki, kanal həm açıq həm də qapalı olanda selektivlik filtrində K^+ ionlarına malik olur, bu ionlar olmadan yəqin ki, bu kanal dağılardı. Gumn olunur ki, K^+ ionları 1 və 3 və ya 2 və 4 vəziyyətlərində mövcud olur və hər biri səkgiz karbonil oksigen atomları ilə əhatə olunur (Şəkil 11-21b və c). Bir neçə K^+ ionu kanalda eyni zamnada elə hərəkət edirlər ki, bir ion eqzoplazmatik üzdə olanda o öz dehidratasiya suyundan qismən ayrılmış şəkildə 1 vəziyyətinə geçir, 2 vəziyyətində olan ion 3 vəziyyətinə atılır, 4 vəziyyətində olan ion isə kanaldan çıxır (Şəkil 11-21c)

Natrium kanalının ilk üç-ölçülü quruluşu 2011-ci ilin sonunda təyin edilmişdir və onun ion seçimi (selektivliyi) mexanizmi indi təyin edilməyə başlanmışdır. Oxşar selektivlik filtrinə malik olan bütün kalium kanallarından fərqli olaraq, natrium kanallarının öyrənilməsi aşkar etdi ki, geniş müxtəliflikli növlərdə müxtəlif tipli natrium kanalları fərqli seçim (selektivlik) filtrinə malik olurlar və bunların hər biri Na^+ ionlarının seçilməsinə nail olmaq üçün fərqli mexanizmdən istifadə edir.



Yamaq-Sıxaclar (Patch-Clamps) İonların Tək Bir Kanalla Hərəkətini Ölçməyə İmkan Verir

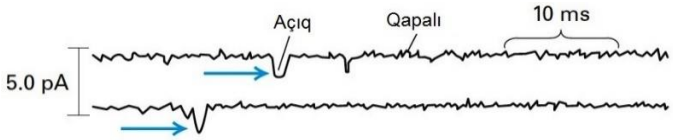
Məlum olanda ki, hüceyrələrin əksəriyyətində plazma membranının bir kvadrat mikrometrində yalnız bir və ya iki kanal yerləşir, **yamaq sıxaclar** adlanan metoddan istifadə etməklə tək bir kanaldan keçən ionu qeyd etmək, bu kanalın açılma və qapanma, həmçinin spesifik ionları keçirmə sürətini ölçmək mümkün olmuşdur. Şəkil 11-22-də göstərildiyi kimi, əmzikdən istifadə etməklə çox kiçik şüşə pipet hüceyrənin səthinə bərkidilir, pipetin ucu daxilində plazma membranın seqmenti yalnız bir və ya çox az kanala malik olur. Yalnız membran yamağından keçən elektrik cərəyanı bu kanallardanion axını kimi keçməlidir. Elektrik qeydedici cihaz ionların axınını, kanallarla gedən elektrik cərəyanı kimi ölçərək aşkar edir, bu adətən kanal açıq olduqda kiçik partlayışlarla (açılmalarla) baş verir (Şəkil 11-23). Elektrik cihazı da membrandan keçən elektrik potensialını müəyyən qiymətlərdə "sıxır" və ya bağlayır (buradan da ***yamaq-sıxac*** sözü meydana gəlmişdir). İonların membran yamağından keçərək daxilə və ya xaricə hərəkətinin kəmiyyət ölçüsü membran potensialını xüsusi "sıxılmış" qiymətdə saxlamaq üçün lazım olan elektrik cərəya-

EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 11-22 Bir ion kanalından keçən cərəyan axını yamaq sıxac ilə ölçülə bilər. (a) Canlı hüceyrələrin plazma membranında fərdi ion kanallarından axan cərəyanın ölçülməsi üçün əsas eksperimentin təşkili. Cərəyan-keçirən duz məlulu ilə doldurulmuş yamaq olunan elektrodu yüngül sorulma ilə plazma membrana quraşdırılır. 0.5 μm diametrlik pipet ucu yalnız bir və ya bir neçə ion kanalı olan rayonu örtür. İkinci elektrod membrandan keçərək sitozola daxil edilir. Ölçən cihaz yalnız plazma membranın bu rayonunda olan kanaldan və ya kanallardan keçən cərəyan axınını ölçür. (b) Kultura olunan neyron hüceyrəsinin və yamaq pipetinin ucunun hüceyrə membranına toxunan hissəsinin mikrofotosu. (c) Fərqli yamaq-sıxac konfiqurasiyaları. 1 *Hüceyrəyə-bərkidilmiş* yamaqlarda elektrod membran sıxacı ətrafında sıx bərkidilməni əmələ gətirir, o müxtəlif ion qatılıqlarının və hüceyrəxarici hormonlar kimi məhlulların bu yamaq daxilində olan kanallara təsirini ölçür. 2 *Bütöv-hüceyrədə* yamaq-sıxac yazılmasında sorulmadan istifadə edilərək membranda elə deşik yaradılır ki, mikropipet hüceyrə daxilinə keçə bilir. Reagentlər mikropipet vasitəsilə sitoplazmaya çatdırıla bilir və onların tam hüceyrə cismində kanallara təsiri yazıla bilir. Həmçinin müxtəlif reagentlərin kanallara təsirini təklikdə ayrılmış yamaqlarla öyrənmək olur və bu müxtəlif ion qatılıqlarının kanallara təsirinin öyrənilməsi üçün ən yaxşı konfuqurasiyadır. 3 *Daxildən-xaricə* olan yamaq-sıxaclarda, hüceyrədaxili reagentləriun kanalların funksiyasına təsiri mikropipetka uclarının müəyyən reagentlərə malik olan məhlula məruz qoyulması ilə ölçülə bilər. 4 Xaricdən yamaqlar membranda qovucuğu yaratmaq üçün pipeti hüceyrədən kənara çəkməklə tam-hüceyrə yamaq konfiqurasiyasından hazırlanır, beləliklə membranın eqzoplazmatik üzünün mikropipeti ucunun məruz qaldığı məhlullara çatmasına imkan verilir. Bu yolla hüceyrəxarici reagentlərin kanalın funksiyasına təsirini ölçmək olur. Hüceyrəyə əlavə edilmiş yamağın əmələ gəldiyi və sonra hüceyrənin kənara itələndiyi daxildən-xaricə yamaq Şəkil 11-24-dəki eksperimentdə istifadə olundu. [(b) hissəsi Elsevier-in razılığı ilə B. Sakmann, "Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels," *Neuron*, 1992, **8**:4,pp 613–629-dan yenidən çap olunur, razılıq Copyright Clearance Center, Inc vasitəsilə alınmışdır.]

nının miqdarına əsasən ölçülür (Şəkil 11-22a). Dörd ümumi yamaq konfiqurasiyasından istifadə olunur (Şəkil 11-22c).

Hüceyrəyə yapışdırılmış yamaqlarda kiçik membran sahəsində kanaldan keçən cərəyanı ölçmək üçün pipet membranın kiçik bir sahəsində möhkəm şəkildə bərkidilir. Tam hüceyrə yamağında plazma membranı deşilir, beləliklə bütün hüceyrə cismindən axan cərəyanı qeyd edə bilmək üçün şüşə pipetin ucu sitoplazmaya daxil ola bilir. Bundan başqa, membranın kiçik yamaqları hüceyrəxarici məhlula məruz qoyulmuş plazma membranın daxili ilə və ya xarici səthi ilə birlikdə hüceyrədən kənarlaşdırılıa bilər. Spesifik molekulların və ya birləşmələrin şüşə pipet daxilindəki məhlula əlavə edilməsi bu reagentlərin ion kanalının funksiyasına təsirini öyrənmək üçün istifadə oluna bilər.

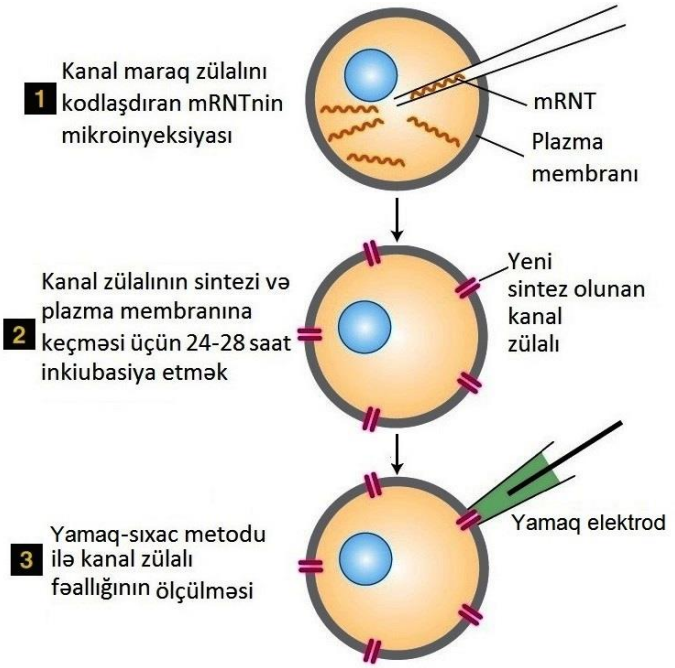
Şəkil 11-23-dəki yamaq-sıxac izləmə bu metodun əzələ hüceyrələrinin plazma membranlarında gərginliklə-qapanan (membran potensialındakı dəyişilməyə cavab olaraq açılır) Na^+ kanallarını öyrənmək üçün istifadəsini təsvir edir. Bizim Fəsil 22-də müzakirə etdiyimiz kimi, bu kanallar normal halda sakitlikdə olan əzələlərdə qapalı olur və neyronal stimullaşmalarda açılır. Hər biri orta hesabla bir Na^+ kanalına malik olan əzələ-hüceyrə membranlarının sıxacları müəyyən gərkinlikdə sıxılır, bu da indiki tədqiqatda olan sakitlikdəki membran potensialından yüngülcə azdır. Bu şərtlər altında, fərdi Na^+ kanalının açılıb sonra da qapanması ilə müsbət yüklərin (Na^+ ionlarının) keçici pulsları membranın eqzoplazmatik üzündən sitozol üzünə kəsib keçir. Hər bir kanal ya tam açıq olur ya da tam qapalı. Belə izləmələrdən kanalın açıldığı və ionların ondan axdığı zamanı təyin etmək mümkündür. Şəkil 11-23-də ölçülmüş kanallarda axin hər kanal üçün bir saniyədə təxminən 10 million Na^+ ionlarıdır, bu ion kanallarının tipik qiymətdir. Yamaq pipet ucunda NaCl-in (hüceyrənin xaricinə uyğun olan) KCl ilə və ya xolin xloridlə əvəz olunması kanaldan gedən cərəyanı ləğv edir və onların K^+ və ya başqa ionlara deyil yalnız Na^+ ionlarına keçirici olmalarını təsdiq edir.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 11-23 Fərdi Na^+ kanallarından ion axını yamaq-sıxac izləmə yolu ilə hesablana bilər. Əzələ plazma membranının iki daxildən-xaricə yamaqları sakitlikdə olan membran potensialından bir qədər az olan potensialda bağlanmışdır. Yamaq pipet NaCl-ə malikdir. Elektrik cərəyanının enən böyük kənarlanmalar kimi yazılmış (mavi oxlar) keçici pulsları (pikoamperlərlə), Na^+ kanalının açılmasını və müsbət yüklərin (Na^+ ionları) mebranı kəsərək içəriyə keçməsini göstərir. Crəyanda kiçik kənarlanmalar fon küylərini göstərir. Açıq kanal vasitəsi ilə orta cərəyan 1.6 pA və ya 1.6×10^{-12} amperdir. Saniyədə 1amper = 1 kulon (C) yük olduğundan bu cərəyan təxminən 9900 Na^+ ionlarının bir kanalla bir millisaniyədə keçməsinə ekvivalentdir: $(1.6\times10^{-12}$ C/s)$(10^{-3}$ s/ms)$(6\times10^{23}$ molekul/mol) ÷ 96500 C/mol. Bax F.J.Sigworth and E. Neher, 1980, *Nature* **287**:447.

Yeni İon Kanalları Ooosit Ekspresiyası və Yamaq-Sıxacın Kombinasiyası ilə Səciyyələndirilə Bilər

İnsanın-xəstəlik-əmələ gətirən genlərinin klonlaşdırılması və insan genomu ardıcıllığının oxunması ehtimal edilən çox kanal zülallarını kodlaşdıran genləri, o cümlədən 67 ehtimal olunan K^+ kanalı zülallarını identifikasiya etdi. Bu zülalların fəaliyyətini səciyyələndirmək üçün bir yol müvafiq mRNT-ni almaq üçün klonlaşdırılmış kDNT-ni hüceyrəsiz sistemdə transkripsiya etməkdir. Bu mRNT-nin qurbağa oositinə inyeksiya olunması və yeni sintez olunmuş kanal zülalının yamaq-sıxac ölçmələri çox zaman onun fəaliyyətini aşkar edə bilir (Şəkil 11-24). Bu eksperimental yanaşma, xüsusilə ona görə faydalıdır ki, qurbağa oositi normal halda özünün səth membranında heç bir kanal zülallarını ekspressiya etmir, beləliklə, yalnız tədqiq olunan kanal bu oositin səth membranında mövcud olur. Bundan başqa, qurbağa oositlərinin böyük ölçüsünə görə yamaq-sıxac tədqiqatlarının kiçik hüceyrələrə nisbətən onlar üzərində aparılması texniki cəhətdən asandır.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 11-24 Oosit ekspressiya sınağı kanal zülallarının normal və mutant formalarının fəaliyyətini müqayisə etmək üçün faydalıdır. Əhatə edən follikul hüceyrələrini uzaqlaşdırmaq üçün birinci follikulyar qurbağa oositinə kollagenozla təsir edilir, çılpaq oosit saxlanılır, ona tədqiq olunan kanal zülalını kodlaşdıran mRNT mikroinyeksiya olunur. Bax T.P. Smith, 1988, *Trends Neurosci*. **11**:250.

11.4 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Qapanmayan İon Kanalları və Sakitləşən Membran Potensialı

- Bütün heceyrələrin plazma membranında, təxminən 60-dan 70-ə qədər mV olan daxili-mənfi elektrik potensialı (voltaj) vardır.
- İonların membranda selektiv axını ilə yaranan elektrik potensialı Nernest tənliyindən istifadə etməklə hesablana bilər (bax Tənlik 11-2).

- Heyvan hüceyrələrində sakitlikdə olan membran potensialı, membranda Na^+ və K^+ qatılıq qradientlərini təşkil edən ATP-ilə-işləyən Na^+/K^+ nasosunun və K^+ ionlarını qatılıq qradientinin azalan istiqamətində xarici mühitə selektiv buraxan sakitlikdə olan K^+ kanalının birgə fəaliyyətinin nəticəsidir (bax Şəkil 11-3)
- Yalnız müxtəlif siqnallara cavab olaraq açılan daha geniş yayılmış ion kanallarından fərqli olaraq, qapanmayan K^+ kanalları adətən açıq olurlar.
- Bitkilərdə və göbələklərdə membran potensialı protonların ATP-ilə-idarə olunan nasosla sitozoldan hüceyrə xaricinə vurulması ilə saxlanılır.
- K^+ kanalları dörd identik subvahidlərdən toplanmışdır, bumnların hər biri ən azı iki konservativ membrana-sarınan α spirala və ion məsaməsini örtən və selektivlik filtrini yaradan qeyri spiral P seqmentinə malikdir (bax Şəkil 11-20).
- K^+ kanalı zülallarının ion spesifikliyi, əsasən K^+ ionunun P seqmentlərindəki spesifik amin turşularının səkkiz karbonil oksigen atomları ilə birləşməsi hesabınadır, bu birləşmə seçilmiş K^+ ionlarının keçmək üçün fəallaşma enerjisini Na^+ və ya başqa ionlarla müqayisədə aşağı edir (bax Şəkil 11-21).
- İonların tək bir kanaldan keçməsini ölçməyə imkan verən yamaq-sıxac metodu kanalın ion keçiriciliyinin təyin edilməsində və onların fəallığına müxtəlif reaqgentlərin təsirinin təyin edilməsində istifadə olunur (bax Şəkil 11-22).
- Rekombinant DNT metodları və yamaq-sıxac metodu qurbağa oositində kanal zülallarının ekspressiyasına və funksional səciyyələndirilməsinə imkan verir (bax Şəkil 11-24).

11.5 Simporter və Antiporterlərlə Birgə-Nəqliyyat

Əvvəlki bölmələrdə biz ATP-ilə-işləyən nasosların membrandan keçən ion qatılıq qradientlərini necə yaratdıqlarını və K^+ kanalı zülallarının plazma membranından keçən elektrik potensialını yaratmaq üçün K^+ qatılıq qradientini necə istifadə etdiyini gördük. Bu bölmədə biz birgə daşıyicilarin (cotransporters) Na^+ və ya H^+ ionlarının qatılıq qradientlərində və ya elektrik potensialında saxlanılan enerjini başqa maddələrin, ola bilsinki qlükoza və ya amin turşuları və ya fərqli ionlar kimi kiçik üzvi molekulların yuxarıya döğru (qatılıq qradientinə qarşı) daşınmasını təmin etmək üçün istifadə etiyini görürük. Belə **birgə daşınmaların** əhəmiyyətli xüsusiyyəti odur ki, maddələrin heç biri təklikdə hərəkət edə bilmir, hər iki maddənin birgə hətəkəti məcburidir, və ya cütləşmiş olur.

Birgə-daşıyıcılar (kotransporterlər) ümumi xüsusiyyətlərini GLUT zülallar kimi yuniporterlərlə bölüşürlər. Bu iki tip daşıyıcı müəyyən quruluş oxşarlığı nümayiş etdirir, ekvivalent sürətlə fəaliyyət göstərir və öz substratlarını daşıyan zaman dövrə edən konformasiya dəyişikliklərinə uğrayırlar. Bunlar onunla fərqlənirlər ki, yuniporterlər yalnız qatılıq qradientinin aşağıya (azalan) istiqamətində termodinamik əlverişli daşınmaları sürətləndirdikləri halda birgə-daşıyıcılar bir maddənin qatılıq qradientinin azalan istiqamətində hərəkəti zaman buraxılan enerjini digər maddənin qatılıq qradientinə qarşı hərəkətinin təmin edilməsinə birləşdirir.

Daşınan molekul və onunla birgə daşınan ion eyni istiqamətdə hərəkət edirsə bu proses **simport** adlanır; əgər onlar əks istiqamətdə hərəkət edirlərsə proses **antiport** adlanır (bax Şəkil 11-2). Bəzi kotransporterlər (birgə daşıyıcılar) yalnız müsbət ionları (kationları) daşıyırlar, digərləri isə yalnız mənfi ionları (anionları) daşıyırlar. Daha başqa kotransporterlər həm kationların həm də anionların birgə daşınmasını həyata keçirirlər. Kotransporterlər bütün orqanizmlərdə, o cümlədən bakteriya, bitki, və heyvanlarda mövcuddurlar və bu bölmədə biz fizioloji cəhətdən əhəmiyyətli olan bir sıra simporter və antiporterlərin fəaliyyətini və funksiyasını təsvir edirik.

Məməlilərin Hüceyrəsinə Na^+-un Daxil Olunması Termodinamik Cəhətdən Əlverişlidir

Məməlilərin hüceyrələri çox saylı müxtəlif tiply Na^+-əlaqəli simporterləri ekspresiya edirlər. İnsan genomu demək olar ki, yüzlərlə müxtəlif tipli nəqliyyat zülallarını kodlaşdırır və onlar geniş müxtəliflikdə molekulları onların qatılıq qradientlərinə qarşı hüceyrə daxilinə daşımaq üçün membranda Na^+ qatılıq qradientində və membrandan keçən daxili-mənfi elektrik potensialında saxlanan enerjini istifadə edirlər. Belə daşıyıcıların hüceyrəyə kifayət qədər yüksək qatılıq gradientinə qarşı substrat toplamaq imkanını necə verdiklərini görmək üçün, bizə ilkin olaraq, Na^+ ionunun daxil olması zamanı meydana gələn sərbəst enerjidəki (ΔG) dəyişikliyi hesablamaq lazımdır. Əvəllər qeyd olunduğu kimi, selektiv keçiriciliyə malik olan membranlardan ionların keçməsini iki qüvvə idarə edir: membrandan keçən gərginlik və ion qatılığı qradienti. Bu qüvvələrin cəmi elektrokimyəvi qradienti təşkil edir. İstənilən ionun membrandan keçərək daşınmasına uyğun olan ΔG sərbəst enerjidəki dəyişikliyi hesablamaq üçün, bizə bu qüvvələrin hər birinin elektrokimyəvi qradientə müstəqil verdiyi töhfələri nəzərə almaq lazımdır.

Məsələn, Na^+ hüceyrə xaricindən daxilinə keçərkən Na^+-un qatılıq qradientindən yaranan sərbəst enejidəki dəyişilmə bu bərabərliklə verilir:

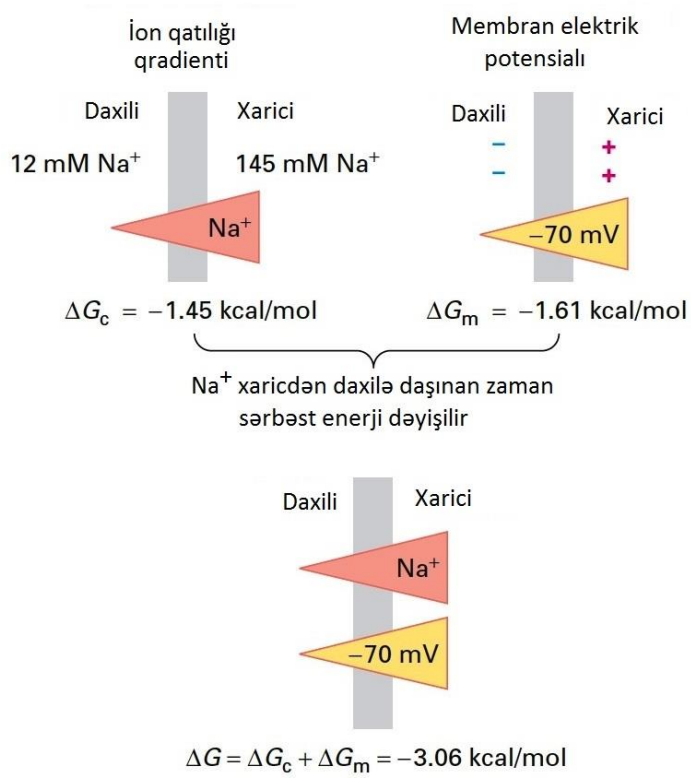
$$\Delta G_c = RT ln \frac{[Na_{daxil}]}{[Na_{xaric}]} \qquad (11\text{-}5)$$

Məməlilərin Şəkil 11-25-də göstərilən, çox hüceyrələri üçün tipik olan, Na_{daxil} və Na_{xaric} qatılıqlarında qatılıq qradientinə görə sərbəst enerjidəki dəyişiklik, ΔG_c, membranın elektrik potensialını nəzərə almadan, 1 mol Na^+ ionlarının hüceyrənin xaricindən daxilinə daşınması üçün –1.45 kkal-dir. Qeyd etmək lazımdır ki, sərbəst enerji mənfidir, bu Na^+-un hüceyrə daxilinə öz qatılıq qradientinin azalan istiqamətində spontan (kortəbii) getdiyini göstərir.

Membran elektrik potensialından əmələ gələn sərbəst enerji dəyişilməsi bu bərabərliklə verilmişdir:

$$\Delta G_m = FE \qquad (11\text{-}6)$$

burada F faradey konstantıdır [=23062 kal/(mol·V)] və E membran elektrik potensialıdır. Əgər, E= –70 mV olarsa, onda membran potensialına görə sərbəst enerji dəyişilməsi ΔG_m, 1 mol Na^+ ionlarının hüceyrə xaricindən daxilinə daşınması üçün, membran qatılıq qradientini nəzərə almadan, –1.64 kkal-dir.



ŞƏKİL 11-25 Na^+ ionlarına təsir edən transmembran qüvvələr. Bütün ionlarda olduğu kimi, Na^+ ionlarının plazma membranını kəsib keçən hərəkəti iki ayrı qüvvənim – ion qatılıqları qradientinin və membran elektrik potensialının cəmi ilə idarə olunur. Məməlilərin hüceyrələri üçün tipik olan Na^+-un daxili və xarici qatılıqlarında bu qüvvələr adətən eyni istiqamətdə təsir göstərirlər, Na^+ ionlarının daxilə hərəkətini energetik cəhətdən əlverişli edirlər.

Faktiki olaraq hər iki qüvvə Na^+ ionlarına təsir etdiyindən, ümumi ΔG iki parsial (qismən) dəyərin cəmidir:

$$\Delta G = \Delta G_c + \Delta G_m = (-1.45) + (-1.61) = -3.06 \text{ kkal/mol}$$

Bu nümunədə, Na^+ qatılıq qradienti və membran elektrik potensialı demək olar ki, Na^+ ionlarının daşınması üçün ümumi ΔG-yə öz töhfəsini bərabər miqdarda verirlər. $\Delta G < 0$ olduğundan, Na^+ ionlarının daxilə hərəkəti termodinamik cəhətdən əlverişlidir. Növbəti bölmədə müzakirə olunduğu kimi, Na^+-un içəriyə hərəkəti başqa ionların və bir sıra kiçik molekulların heyvan hüceyrələri daxilinə və xaricinə yuxarıya istiqamətdə daşınmasını gücləndirmək üçün istifadə olunur. Na^+ ionlarının qapanan Na^+ kanalları vasitəsi ilə tez və energetik cəhətdən əlverişli hərəkəti, bizim Fəsil 22-də müzakirə etdiyimiz kimi, sinir və əzələ hüceyrələrinin təsir potensialını yaratmaq üçün də kritik əhəmiyyətlidir.

Na^+-Əlaqəli Simporterlər Heyvan Hüceyrələrinə Qlükozanın və Amin Turşularının Yüksək Qatılıq Qradientinə Qarşı İmportunu Mümkün Edir

Orqanizmin hüceyrələrinin əksəriyyəti qlükozanı qandan qlükozanın qatllıq qradientinin *aşağıya, azalan* istiqamətində import edir, bu importu həyata keçirmək üçün GLUT zülallarından istifadə edirlər. Amma, kiçik bağırsağın daxili qatını və böyrək borucuqlarını təşkil edən hüceyrələr kimi müəyyən hüceyrələrə hüceyrəxarici mayedən qlükozanı (həzm məhsulları və ya sidik) çox böyük qatılıq qradientinə qarşı (qlükozanın qatılığı hüceyrə daxilində daha yüksəkdir) import etmək lazımdır. Belə hüceyrələr bir molekul qlükozanın importunu iki Na^+ ionunun importu ilə birləşdirən zülal *iki-Na^+/bir-qlükoza simporterdən* istifadə edirlər:

$$2Na^+_{xaric} + Qlükoza_{xaric} \rightleftharpoons 2Na^+_{daxil} + Qlükoza_{daxil}$$

Miqdarca, iki Na^+ ionunun və bir qlükoza molekulunun simportunun sərbəst enerji dəyişilməsi belə yazıla bilər:

$$\Delta G = RTln\frac{[Qlükoza_{daxil}]}{[Qlükoza_{xaric}]} + 2RTln\frac{[Na^+_{daxil}]}{[Na^+_{xaric}]} + 2FE \qquad (11\text{-}7)$$

Beləliklə ümumi reaksiya üçün ΔG, qlükoza qatılıq qradienti (daşınan 1 molekul), Na^+ qatılıq qradienti (2 Na^+ ionu daşınır) və membran potensialı (2 Na^+ ionu daşınır) tərəfindən əmələ gələn sərbəst enerji dəyişilməsinin cəmidir. Şəkil 11-25-də göstərildiyi kimi, məməlilərin hüceyrəsində 1 mol Na^+ ionunun elektrokimyəvi qradientinin aşağıya, azalan istiqamətdə keçməsi ilə buraxılan enerji daşınan hər bir mol Na^+ üçün təxminən –3 kkal, ΔG sərbəst enerji dəyişilməsinə malikdir. Beləliklə, iki mol Na^+ daxilə daşınması üçün ΔG bu miqdardan iki dəfə çox, təxminən –6 kkal olmalıdır. Natriumun importunun mənfi sərbəst enerji dəyişilməsi qlükozanın yuxarıya (qatılığın artan istqaməti) daşınması ilə, müsbət ΔG olan proseslə birləşir. Biz tarazlıqda qlükozanın natriumla-bağlı importunu ΔG=0 nəzərə almaqla, qlükozanın Na^+-la-işləyən simporterlərin fəaliyyəti vasitəsi ilə yaranan (daxildə xaricdən yüksək olan) qatılıq qradientini hesablaya bilərik. 11-7 bərabərliyində natriumun importu qiymətini əvəz etməklə və ΔG=0 qurmaqla biz görürük ki,

$$0 = RTln\frac{[Qlükoza_{daxil}]}{[Qlükoza_{xaric}]} - 6kal$$

buradan biz hesablaya bilərik ki, tarazlıqda bu nisbət: $Qlükoza_{daxil}$ / $Qlükoza_{xarıc}$ = ~30000 olacaq. Beləliklə, iki mol Na^+-un daxilə axması qlükozanın hüceyrədaxili qatılığını yaradır, bu da onun hüceyrəxarici qatılığından ~30000 dəfə yüksəkdir. Əgər, hər qlükoza molekuluna görə yalnız bir Na^+ ionu import olunardısa (ΔG təxminən –3 kkal/mol), onda mümkün olan enerji qlükoza qatılıq qradientini (daxil/xaric) yalnız təxminən 170-qat yarada bilərdi. Beləliklə, iki Na^+ ionunun daşınmasını bir qlükozanın daşınması ilə birləşdirməklə, iki-Na^+/bir qlükoza simporter zülalları hüceyrəyə imkan verir ki, qlükozanı hüceyrəxarici qatılıqla nisbətdə daxildə çox yüksək qatılıqda toplasınlar. Bu o deməkdir ki, bağırsaq lümenlərimdə və ya böyrək borucuqlarında qlükozanın hətta ən aşağı qatılıqlarında belə səmərəli şəkildə bağırsağın daxili örtük hüceyrələrinə daşınır və bədəndən itirilmir.

Guman olunur ki, iki-Na^+/bir-qlükoza simporter, 14 transmembran α spirala malikdir, onun həm N həm də C sonluğu sitozola uzanır. Şəkil 11-26 Na^+/qlükoza simporterlərlə daşınmanın müasir modelini təsvir edir. Bu model, birgə daşınan ionları tələb etməyən GLUT kimi yuniport daşıyıcılarda meydana gələn analoji zülalda konformasiya dəyişikliyinə səbəb olur (Şəkil 11-5 ilə müqayisə et). Bütün substratların

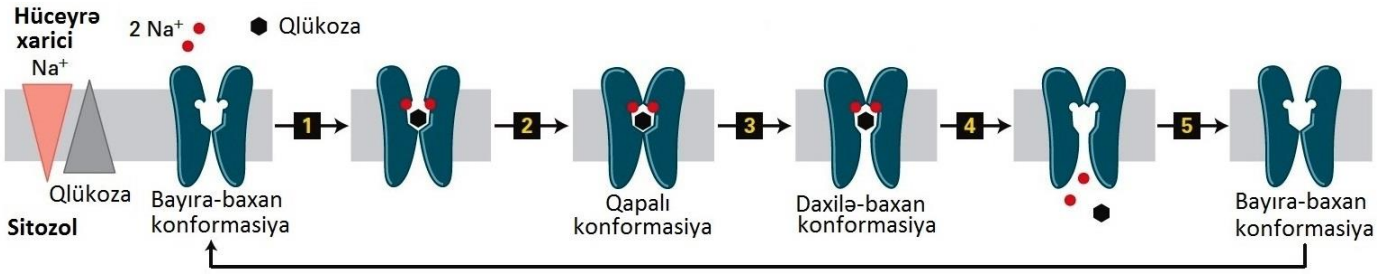
hüceyrəxarici domendə öz saytlarına birləşməsi zülalın substrat-birləşdirən saytlarını xaricə-baxandan daxilə-baxana çevirən konformasiya dəyişikliyinin baş verməsindən oncə tələb olunur, bu, qlukozanın daxilə axması ilə Na^+-un birləşməsini təmin edir.

İnsanlarda iki Na^+/qlükoza simporteri vardır. SGLT1 kiçik bağırsağın daxili divarını örtən sorucu hüceyrələrdə və eləcə də böyrək borucuqlarının divarlarını daxildən örtən epiteli hüceyrələrində tapılmışdır. SGLT2 yalnız böyrək borucuqlarında tapılmışdır, o SGLT1 ilə birlikdə insanın əmələ gələn sidiyindən qlükozanı qana sorur. SGLT2-nin ingibirləşməsi qlükozanın sidiklə itirilmnəsinə səbəb olur və qanda qlükozanın səviyyəsi aşağı enir, ona görə də, SGLT2 ingibitor II tip diabetin müalicəsində potensial istifadəyə malikdir. Həqiqətən də, SGLT1-i deyil, SGLT2-ni selektiv ingibirləşdirən bir sıra dərman namizədləri yaradılaraq inkişaf etdirilmiş və ya hal hazırda tibbi yoxlamadan keçirilir və bunlardan birinə ABŞ və Kanadada istifadə üçün icazə verilmişdir.

Hüceyrələr Na^+-la-işləyən simporterləri qlükozadan savayı başqa maddələri də hüceyrə daxilinə yüksək qatılıq qradientinə qarşı daşımaq üçün istifadə edirlər. Məsələn, bir neçə tip Na^+/amin turşusu simporterləri hüceyrəyə çox sayda amin turşularını hüceyrə daxilinə daşımağa imkan verirlər. Başqa bir nümunə kimi, Na^+/neyrotransmitter simporterlər Na^+-un importunu neyrotransmitterin sorulması və yenidən istifadəsi ilə bağlayır və onlar antidepressantlar kimi bir çox müalicəvi dərmanların hədəfidirlər. Onlar həmçinin kokain və amfetaminlər kimi narkotik sui-istifadənin hədəfidirlər.

Simporterin Necə İşlədiyini Bakterial Na^+/Amin turşusu Simporteri Aşkar Edir

Bu vaxta qədər məməlilərin heç birinin Na^+-əlaqəli simporterinin üç-ölçülü quruluşu təyin edilməmişdir, amma bir sıra homoloji bakteriyal Na^+/substrat simporterləri quruluşu simporterin fəaliyyəti barədə kifayət qədər məlumatı təmin etmişdir. Şəkil 11-27a-da göstərilən bakterial iki-Na^+/bir-leysin simporter 12 membrana-sarınan α spiraldan təşkil olunmuşdur. Spirallardan ikisi (1 və 6) membranın ortasında qeyri spiral seqmentə malikdir və bunlar leysin-birləşdirən saytın bir hissəsini təşkil edirlər.



ŞƏKİL 11-26 İki-Na^+/bir qlükoza simporterin fəaliyyət modeli. Birləşmə saytları bayıra-baxan konformasiyaya Na^+ və qlükozanın eyni zamanda birləşməsi (pillə 1) zülalda elə konformasiya dəyişikliyinə səbəb olur ki, birləşmiş substrat keçici olaraq keçidi bağlayır, hər iki mühitə dissosasiya etmək mümkün olmur (pillə 2). Pillə 3-də zülal daxilə-baxan saytları olan üçüncü konformasiyanı alır. Birləşən Na^+ və qlükozanın sitozola dissosasiyası (pillə 4) zülalın öz ilkin bayıra-baxan konformasiyasına qayıtmasına imkan verir (pillə 5), əlavə substratın daşınması üçün hazır olur. [Bu və digər oxşar Na^+-la-bağlı simporterlərin fəaliyyətinə və quruluşuna ətraflı bax H.Krishnamurthy et al., 2009, *Nature* **459**:347-355.]

Leysinin və iki Na^+ ionlarının birləşməsində iştirak edən qalıqlar membrana-sarınan seqmentin ortasında yerləşirlər (Şəkil 11-26-da iki-Na^+/bir-qlükoza üçün verildiyi kimi) və üç-ölçülü fəzada bir-birinə çox yaxın yerləşirlər. Bu yaxınlıq göstərir ki, bu daşıyıcılarda amin turşusu və ion daşınmasının birləşməsi substratların birbaşa və ya təxminən birbaşa fiziki qarşılıqlı əlaqənin nəticəsidir. Həqiqətən də, Na^+ ionarından biri daşınan leysinin karboksil qrupuna birləşmişdir (Şəkil 11-27b). Beləliklə, maddələrdən heç biri digəri olmadan daşıyıcıya birləşə bilmir. İki Na^+ ionlarının hər biri daşıyıcıda səkgiz oksigen atomuna birləşir. Məsələn, natrium 1, daşıyıcının (transporterin) bir neçə amin turşusunun karbonil oksigeninə, həmçinin bir treonin qalığının karboksil oksigeninə və hidroksil oksigeninə birləşir. Eyni dırıcıdı əhəmiyyətlidir ki, kalium kanalında birləşmiş su molekulları ilə əhatə olunan K^+ ionlarında olduğu kimi (bax 11-21), birləşmiş Na^+ atomlarının heç birini əhatə edən su molekulları yoxdur. Beləliklə, Na^+ ionları daşıyıcıya birləşəndə öz dehidratasiya suyunu itirən kimi, onlar eyni geometriya ilə altı oksigen atomuna birləşirlər. Bu da, Na^+ ionlarının birləşməsi üçün tələb olunan enerji dəyişilmələrini azaldır və K^+ kimi başqa ionların Na^+-un yerinə birləşməsinə mane olur.

Şəkil 11-27-də təsvir edilmiş quruluşun diqqəti cəlb edən bir xüsusiyyəti odur ki, birləşmiş Na^+ ionalrı və leysin *blok olunurlar* – yəni, onlar zülaldan kənara, istər əhatə olunduqları hüceyrəxaricə və istərsə də sitoplazmatik mühitə diffuziya edib çıxa bilmirlər. Bu quruluş, daşınma prosesində aralıq mərhələni təmsil edir (bax Şəkil 11-26), zülal eqzoplazmatik üzə baxan konformasiyadan birləşmə saytı sitozola baxan konformasiyaya dəyişilir.

Na^+-Əlaqəli Ca^{2+} Antoporter Ürək Əzələ Dartılmasının Gücünü Tənzimləyir

Bütün əzələ hüceyrələrində, sitozolda Ca^{2+} qatılığının qalxması əzələ dartılmasına səbəb olur. Ürək əzələ hüceyrələrində, *üç-Na^+/bir-Ca^{2+} antiporteri* sitozolda Ca^{2+} qatılığının aşağı

saxlanılmasında əvvəllər müzakirə olunmuş plazma membranı Ca^{2+}-ATP-azadan daha çox əhəmiyyətli rol oynayır. Bu *kation antiporter*lə vasitələnən daşınma reaksiyaları aşağıdakı kimi yazıla bilər:

$$3Na^{+}_{xaric} + Ca^{2+}_{daxil} \rightleftharpoons 3Na^{+}_{daxil} + Ca^{2+}_{xaric}$$

Qeyd edək ki, üç Na^+ ionunun daxilə keçməsi bir Ca^{2+} ionunun [Ca^{2+}] təxminən ~2×10^{-7} M hüceyrədaxili mühitdən, [Ca^{2+}] təxminən ~2×10^{-3} M hüceyrəxarici mühitə, təxminən 10000 dəfə yüksək qradientlə (hüceyrə xaricində yüksəkdir) sitozoldan xaricə eksport olunması üçün tələb olunr. Sitozolda Ca^{2+} aşağı salmaqla, Na^+/Ca^{2+} antiporter ürək əzələ dartılmasının sərtliyini azaldır.

Ürək əzələ hüceyrələrinin plazma membranında Na^+/K^+ ATP-aza bədənin başqa hüceyrələrində olduğu kimi, Na^+-əlaqəli Ca^{2+} antiporterlə Ca^{2+}-un eksportu üçün lazım olan Na^+ qatılıq qradientini yaradır. Əvəlldə qeyd olunduğu kimi, Na^+/K^+ ATP-azanın ouabain və diqoksin dərmanları ilə ingibirləşməsi sitozolda K^+ qatılığını azaldır və burada daha əhəmiyyətli olan, sitozolda eyni zamanda Na^+-u qaldırır. Bunun nəticəsində membranda yaranan aşağı Na^+ elektrokimyəvi qradienti Na^+-əlaqəli Ca^{2+} antiporterin az səmərəli fəaliyyət göstərməsinə səbəb olur. Nəticədə, çox az Ca^{2+} ionu eksport olunur və sitozolda Ca^+ qatılığı artır, bu da əzələnin daha möhkəm dartılmasına səbəb olur. Ürək əzələ dartılmasının gücünü artırma qabliyyətinə görə, Na^+/K^+ ATP-zanı ingibirləşdirən ouabian və diqoksin kimi dərmanlar tıxac olunmuş (konqestiv) ürək çatışmazlıqlarının müalicəsində geniş istifadə olunurlar.

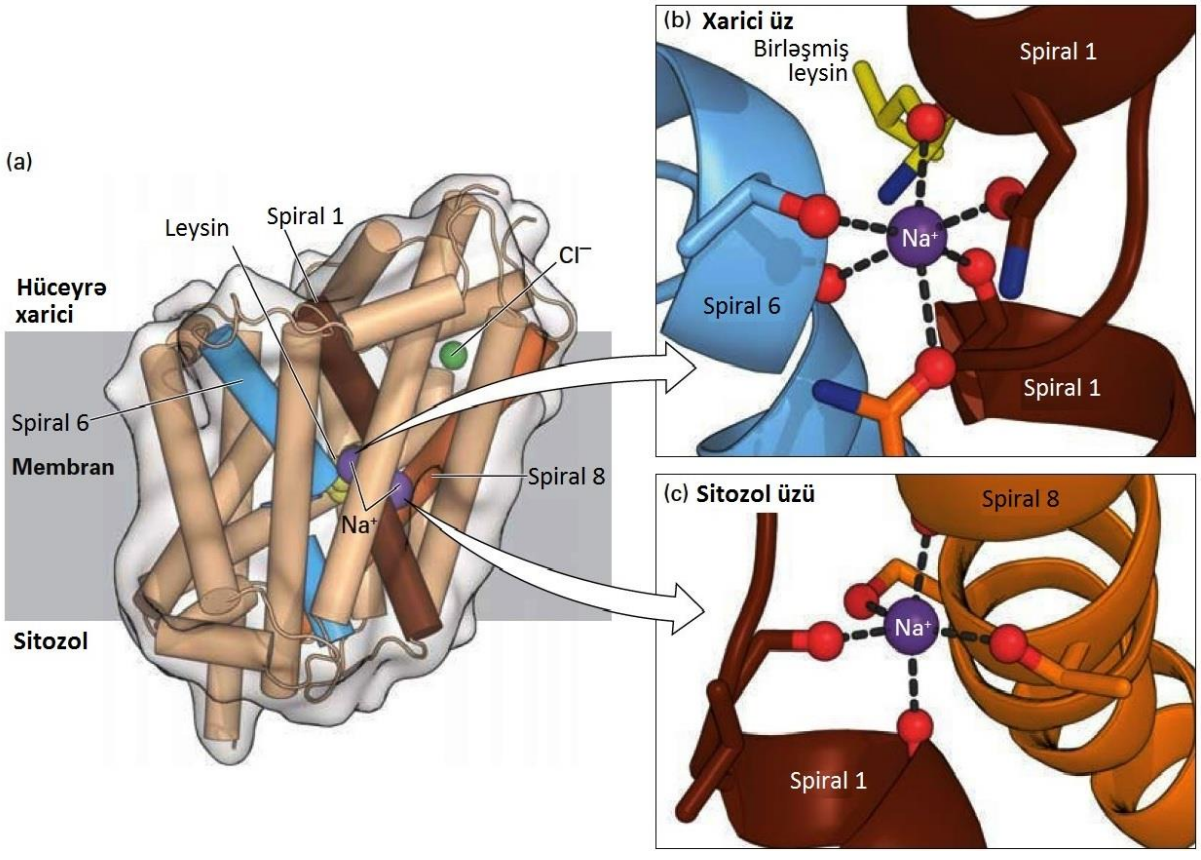
Bir-sıra Birəg-daşıyıcılar Sitozol pH-nı Tənzimləyir

Qlükozanın anaerob metabolizmi süd turşusunu verir, aerob metabolizmi isə CO_2 əmələ gətirir, o da öz növbəsində su ilə birləşərək karbonat turşusunu (H_2CO_3) əmələ gətirir. Bu zəif turşu dissosasiya edərək H^+ ionlarını (proton) əmələ gətirir, əgər bu protonların artıqlığı hüceyrədən uzaqlaşdırılmazsa sitozolun pH-ı kəskin surətdə düşəcək, hüceyrənin fəaliyyəti üçün təhlükə yaranacaqdır. İki tip birgə-daşıyıcı zülallar, heyvan hüceyrələrində metabolizm zamanı yaranan protonun "artıq hissəsinin" uzaqlaşdırılmasına kömək edir. Bunlardan biri *$Na^+HCO_3^-/Cl^-$ antiporter*dir, bir Cl^- ionunu eksport etmək üçün mübadilədə bir Na^+ ionunu $HCO3^-$ ionu ilə birlikdə import edir. Sitozol fermenti *karbon anhidraza* import olunan HCO_3^- ionlarının CO_2 və OH^- (hidroksil) ionuna dissosasiyasını kataliz edir:

$$HCO_3^- \xrightleftharpoons{\text{Karbon anhidraza}} CO_2 + OH^-$$

OH^- ionları hüceyrədaxili protonlarla birləşir, suyu əmələ gətirir və CO_2 diffuzuya edərək hüceyrədən çıxır. Beləliklə, bu daşıyıcının ümumi fəaliyyəti sitozolda olan H^+ ionlatını *sərf etmək*, bununla da sitozolun pH-nı *qaldırmaq*dır. Sitozol pH-ın qaldırılmasında *Na^+/H^+ antiporter* də əhəmiyyətli rol oynayır, onlar bir Na^+ ionunun qatılıq qradientlərinin azalan istiqamətində hüceyrəyə daxil olmasını bir H^+ ionunun çıxarılması (eksportu) ilə bağlayır.

Müəyyən şərait daxilində, sitozolda pH normal 7.2-7.5-dən yuxarıya qədər qalxır. Yuxarı pH-ın yaranması ilə əlaqəli olan



ŞƏKİL 11-27 *Aquifex aeolicus* bakteriyasının iki-Na^+/bir-leysin simporterinin üç-ölçülü quruluşu. (a) Birləşmiş L-leysin, iki Na^+ ionu və Cl^- ionu uyğun olaraq sarı, bənövşəyi və yaşıl rənglərdə göstərilir. Na^+ və ya leysinin birləşdiyi üç membrana sarınan α spiral qonur, mavi və narıncı rənglənmişdir. (b,c) İki Na^+ ionunun 1-ci (*qonur*), 6-cı (*mavi*) və ya 8-ci (*narıncı*) spirallarının hissəsi olan əsas-zəncirin karbonil və ya yan zəncirin karboksil qruplarının (qırmızı) oksigen atomlarına birləşməsi. Əhəmiyyətlidir ki, natrium ionlarının biri daşınan leysinin karboksil qrupuna da birləşir (b hissəsi). Bu və buna oxşar Na^+-birləşən daşıyıcıların quruluşunun və fəaliyyətinin ətraflı detallarına görə bax H. Krishnamurti et al., 2009, *Nature* **459**:347-355. [A. Yamashita et al., 2005, *Nature* **437**:215, PDB ID 2a65.

OH^- ionlarının çoxluğunun öhdəsindən gəlmək üçün əksər heyvan hüceyrələri plazma membranında HCO_3^- və Cl^- ionlarının biri-üçün-bir mübadiləsini kataliz edən *anion antiporter*dən istifadə edirlər. Yüksək pH-da, bu *Cl^-/HCO_3^- antiporter* bir molekul Cl^--un importunda mübadilə kimi bir molekul HCO_3^- (CO_2 və OH^- kompleksi kimi baxıla bilir) eksport edir, bununla da sitozolun pH-nı aşağı salır. Cl^--un qatılıq qradientinin azalan istiqamətində importu (Cl^-_{xarici} > $Cl^-_{sitozol}$; bax cədvəl 11-2) HCO_3^- eksportunu gücləndirir.

Bu üç antiporter zülalın hamısının fəallığı sitozol pH-ı ilə tənzimlənərək hüceyrənin sitozol pH-na nəzarət edən incə nizamlanmış mexanizmi təmin edilir. Sitozol pH-nı qaldırmaq üçün fəaliyyət göstərən iki antiporter sitozolun pH-ı aşağı düşərkən fəallaşır. Buna oxşar olarq, pH-7.2-dən yuxarı qalxması Cl^-/HCO_3^- antiporteri stimullaşdırır, HCO_3^--ın sürətli eksportuna və sitozol pH-ın enməsinə səbəb olur. Bu qaydada, inkişaf edən hüceyrələrdə sitozolda pH 7.4-ə çox yaxın nizamlanır.

Anion Antiporter CO_2-nin Qırmızı Qan Hüceyrələri ilə Daşınması üçün Əhəmiyyətlidir

Transmembran anion mübadiləsi eritrositlərin fəaliyyəti üçün çox əhəmiyyətlidir: lazımsız CO_2-nin periferial toxumalardan atılmaq üçün ağciyərlərə daşınması. Hüceyrələrdən kapillyar damarlara buraxılan lazımsız CO_2 sərbəst şəkildə eritrosit membranından diffuziya edir (Şəkil 11-28a). CO_2 özünün qaz formasında, karbonlaşdırılmış içkiləri açanda göründüyü kimi, sitozol və qan plazması kimi su məhlulunda pis həll olur. Amma, böyük miqdarda güclü təsirə malik olan karbon anhidraza eritrositlər daxilində CO_2-ni hidroksil (OH^-) ionları ilə birləşdirir suda həll olan bikarbonat (HCO_3^-) anionlarını əmələ gətirir. Bu proses qırmızı qan hüceyrələrinin sistemin kapillyarlarında (toxmalarda) olduğu və oksigeni qan plazmasına buraxdığı zaman baş verir. Oksigenin hemoqlobindən buraxılması onda konformasiya dəyişikliyini induksiya edir, bu da qlobin polipeptidindəki histidin yan zəncirinin protonu birləşdirməsini mümkün edir. Beləliklə, qırmızı qan hüceyrələri kapillyarlar sistemində olanda su hemoqlobinə birləşən protona (H^+) və CO_2 ilə reaksiyaya girərək HCO_3^- anionunu əmələ gətirən OH^- qalığına parçalanır.

Antiporter AE1 ilə kataliz olunan reaksiyada, sitozoldakı HCO_3^- ionları daxil olan Cl^- ionları ilə mübadilədə eritrositlərdən bayıra daşınır:

$$HCO_3^-_{daxil} + Cl^-_{bayır} \rightleftharpoons HCO_3^-_{bayır} + Cl^-_{daxil}$$

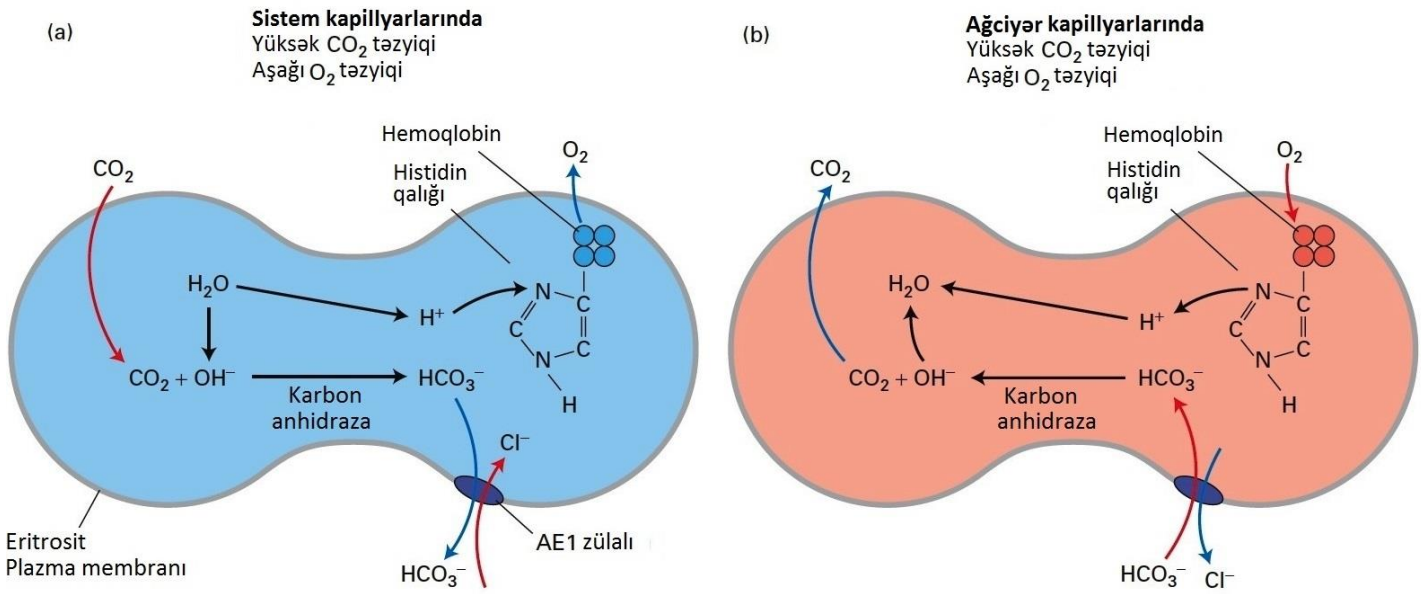
(bax Şəkil 11-28a). Tam anion-mübadiləsi prosesi 50 millisaniyə (ms) müddətində tamamlanır, bu zaman müddətində hər bir hüceyrədən 5×10^9 HCO_3^- ionu qatılıq qradientlərinin azalan istiqamətində eksport olunur. Əgər anion-mübadiləsi baş verməzsə, fiziki məşqlər zamanı əmələ gələn artıq miqdarda CO_2 sitozolu qələviyə çevrdiyindən, HCO_3^- ionları eritrositlər içərisində toksik səviyyəyə qədər toplanmş olar. HCO_3^--ın mübadiləsi (bərabər miqdarda OH^- + CO_2) sitozol pH-nı neytrala yaxın saxlayır. Normal halıda, qanda CO_2-nin təxminən 80 faizi eritrositlər daxilində əmələ gələn HCO_3^- şəkilində daşınır, anion-mübadiləsi bu HCO_3^--ın təxminən üçdə ikisinin hüceyrələrdən bayırda qan plazması ilə daşınmasına imkan verirməklə toxumalardan ağ ciyərə daşına bilən CO_2-nin miqdarını arrtırır. CO_2-ın bədəni tərk etdiyi ağ ciyərdə anion mübadiləsi prosesinin ümumi istiqaməti geriyə dönür (Şəkil 11-28b).

AE1 membranın əks tərəflərində hüceyrənin elektroneytrallığını saxlamaq üçün anionların tələb olunan dəqiq biri-üçün-biri ardıcıl mübadiləsini kataliz edir, yalnız hər 10000 və ya buna yaxın daşınma dövrəsində bir anion membranın bir tərəfindən digər tərəfinə biristiqamətli hərəkət edir. AE1, anion daşınmasını kataliz edən, ən azı 12 transmembran α spiralda bükülən, membrana-batmış domendən və müəyyən sitoskelet zülallarını membrana lövbər edən sitozola baxan domendən təşkil olunmuşdur (bax Şəkil 17-21).

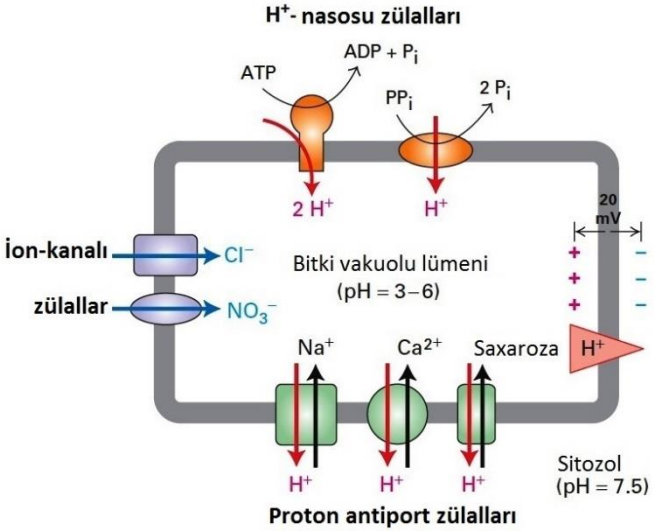
Çoxsaylı Nəqliyyat Zülalları Bitki Vakuollarının Metabolit və İonları Toplamasına İmkan Verir

Bitki vakuollarının lümeni sitozola (pH 7.5) daha çox turşdur (pH 3-6). Vakuolların turşuluğu V-sinif ATP-ilə-işləyən proton nasosu ilə (bax Şəkil 11-9) və bitkilər üçün unikal olan pirofosfatla-işləyən proton nasosu ilə saxlanılır. Vakuol membnranında yerləşən bu nasosların hər ikisi H^+ ionlarını qatılıq qradientinə qarşı vakuol lümeninə import edir. Bu proton nasoslarının və anion kanallarının birlikdə (kombinasiya olunmuş) fəaliyyəti vakuol membranında daxildə-mənfi olan 20 mV-a yaxın elektrik potensialını, həmçinin çox əhəmiyyətli pH qradientini yaradır (Şəkil 11-29).

Bitkinin vakuol membranı boyunca proton elektrokimyəvi qradient, heyvan hüceyrələrinin müxtəlif antiporterlərlə ionların və ya kiçik molekulların selektiv ötürülməsi və ya ekstruziyaısını (itələyib çıxarılması) həyata keçirdiyi plazma membranı boyunca Na^+ elektrokimyəvi qradienti kimi eyni yolla istifadə olunur. Məsələn, gündüz yarpaqlarda fotosintez zamanı yaranan artıq miqdarda saxaroza vakuollarda saxlanılır, gecə müddətində isə, toplanan saxaroza sitoplazmaya keçir və CO_2 və H_2O-ya parçalanır, onunla yanaşı ADP və Pi-dan ATP sintez olunur. Vakuol membranındakı *proton/saxaroza antiporter* saxarozanın bitki vakuolunda toplanması üçün fəaliyyət göstərir. Saxarozanın daxilə hərəkəti H^+-in bayıra hərəkəti ilə güclənir, bu zaman onun qatılıq qradienti (lümendən > sitozola) və vakuol membranından keçən, sitozolda-mənfi olan potensialı ona üstünlük verir (bax Şəkil 11-29). Ca^{2+} və Na^+ ionlarının sitozoldan onların qatılıq qradientlərinə qarşı vakuola sorulması oxşar şəkildə proton antiporterlər vasitəsi ilə həyata keçirilir.



ŞƏKİL 11-28 Karbon-iki-oksidin qanda daşınması Cl^-\HCO_3^- antiporterini tələb edir. (a) Kapillyarlar sistemində karbon iki oksid qazı eritrosit plazma membranından diffuziya edir və karbon anhidraza fermenti vasitəsilə həll olan HCO_3^--ə çevrilir, eyni zamanda, oksigen hüceyrəni tərk edir və hemoqlobin protonla birləşir. Anion antiporter AE1 (bənövşəyi) Cl^- və HCO_3^- ionlarının membranda geriyə dönən mübadiləsini kartaliz edir. Ümumi reaksiya HCO_3^--ın hüceyrədən azad olmasına səbəb olur, bu da CO_2-nin toxumalardan ağ ciyərə maksimal daşınması üçün və qan hüceyrələrində pH neytrallığının saxlanması üçün çox əhəmiyyətlidir. (b) Karbon iki oksidin ifraz olunduğu ağ ciyərlərdə ümumi reaksiya geriyə dönəndir. Əlavə müzakirələr üçün tekstə bax.



ŞƏKİL 11-29 Bitki vakuollarında ionların və saxarozanın qatılığı. Vakuol membranları iki tip proton nasoslarına malikdir (narıncı): V-sinif H^+ ATP-aza (*solda*) və pirofosfat-hidroliz edən proton nasosu (*sağda*), bütün başqa nəqliyyat zülallarından fərqlənirlər və demək olar ki, bitkilər üçün unikaldırlar. Bu nasoslar lüminal aşağı pH-ı yaradırlar, eləcə də, H^+ ionlarını daxilə vürmaq sayəsində vakuol membranında daxildə-müsbət elektrik potensialını yaradırlar. Daxildə-müsbət potensial Cl^- və NO_3^- ionlarının ayrıca kanal zülalları (bənövşəyi) vasitəsi ilə sitozoldan keçməsini gücləndirir. H^+ qradienti ilə işləyən proton antiporterlər (yaşıl) Na^+ və Ca^{2+} ionlarını və saxarozanı vakuol daxilində toplayır. Bax B.J.Barkla and O.Panyija, 1996, *Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol*. **47**:159-184 və P.A. et al., 1992, *Trends Biochem.Sci*.**17**:348.

Bitki vakuol membranlarında nəqliyyat zülallarının dərk edilməsi bütün dünyada yayılan yüksək-şoran (NaCl) torpaqlarda kənd təsərrüfatı məhsuldarlığının artırılması baxımından böyük potensiala malikdir. Kənd təsərrüfatında istifadə olunan bitkilərin əksəriyyəti belə duzlu torpaqlarda inkişaf edə bilmədiyindən kənd təsərrüdatı tədqiqatçıları uzun müddət ənənəvi seleksiya yolu ilə duza-davamlı bitkiləri yaramaq barədə düşündülər. Vakuol Na^+/H^+ antiporterini kodlaşdıran genin klonlaşdırılmasının mümkün olması ilə tədqiqatçılar indi bu nəqliyyat zülalını yüksəkekspressiya edən və Na^+-un vakuola keçirilməsini gücləndirən transgen bitkiləri yarada bilirlər. Məsələn, vakuolar Na^+/H^+ antiporterini yüksəkekspressiya edən transgen tomat bitkisi, təbii formalı (yabanı) tomat bitkisini öldürən yüksək qatılıqlı Na^+ olan torpaqlarda bitə, çiçəkləyə və meyvə verə bilir. Maraqlıdır ki, bu transgen tomat bitkisinin yarpaqları böyük miqdarda duzu toplasa da, onların meyvələri çox az miqdarda duza malik olurlar.

11.5 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Simport və Antiportlarla Birgə-Nəqliyyat

- Yarimkeçirici membranlarda elektrokimyəvi qradient ionların transmembran zülallarla hərəkətinin istiqamətini müəyyən edir. Elektrokimyəvi qradienti təşkil edən iki güc – membran elektrik potensialı və ion qatılıq qradienti – eyni və

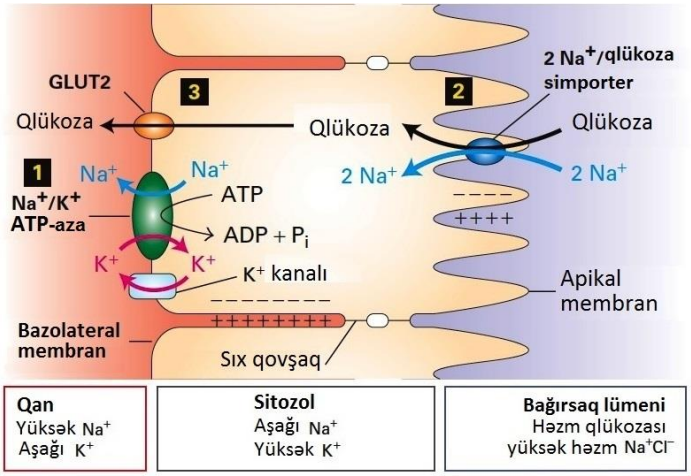
ya əks istiqamətlərdə fəaliyyət göstərə bilirlər (bax Şəkil 11-25).

- Kotransporterlər ionların (adətən H^+ və ya Na^+) öz elektrokimyəvi qradientlərinin azalan istiqamətindəki hərəkətindən ayrılan enerjidən kiçik molekulların və ya müxtəlif ionların qatılıq qradientlərinə qarşı hərəkətini gücləndirmək üçün istifadə edirlər.
- Kiçik bağırsağın daxili qatını və böyrək borucuqlarını əmələ gətirən hüceyrələr simport zülallarına malikdirlər, bunlar Na^+-un energetik cəhətdən əlverişli girişini qlükozanın öz qatılıq qradientinə qarşı importunda istifadə edir (bax Şəkil 11-26). Amin turşuları da hüceyrəyə Na^+-la cütləşən simporterlərlə daxil olurlar.
- Bakterial Na^+/amin turşusu simporterinin molekulyar quruluşu Na^+ və leysinin birləşməsnin necə biryerə bağlı olduğunu göstərir və birləşmiş substratların zülaldan çıxa bilməyən qapalı bir nəqliyyat intermediatlarının ani təsvirini verir (bax Şəkil 11-27).
- Ürək əzələ hüceyrələrində Ca^{2+}-un eksportu Na^+-un kation antiporterlə import olunması ilə birləşərək onu gücləndirir və hər bir eksport olunan Ca^{2+} ionuna qarşı üç Na^+ ionu daxilə daşınır.
- Aşağı pH-da fəallaşan iki kotransporter heyvan hüceyrələrində karbon və süd turşularının metabolik yaranmasına baxmayaraq sitozolda pH-ın 7.4-ə çox yaxın saxlanılmasına kömək edir. Bunlardan biri Na^+/H^+ antiporter protonların artıq hissəsini eksport edir. Digəri, $Na^+HCO_3^-/Cl^-$ kotransporter isə HCO_3^--ı import edir, o isə sitozolda dissosasiya edərək OH^- ionlarını yaratmaqla mühitin pH-nı qaldırır.
- Sitozol pH-ı normadan yuxarı qalxan zaman yüksək pH-da fəallaşan Cl^-/HCO_3^- antiporter HCO_3^--ı eksport etmək üçün fəaliyyət göstərir və pH-ın enməsinə səbəb olur.
- Eritrosit membranında Cl^-/HCO_3^- antiporter AE1, qanın CO_2-ni toxumalardan ağ ciyərə daşıma imkabnlarını artırır (bax Şəkil 11-28).
- Saxarozanın, Na^+-un, Ca^{2+}-un və başqa maddələrin bitki vakuoluna sorulması vakuol membranında olan proton antiporterlərlə aparılır. Membrandakı ion kanalları və proton nasoslarının, bu proton antiporterləri gücləndirmək üçün kifayət qədər böyük proton qatılığı gradientini yaratması vacibdir (bax Şəkil 11-29).

11.6 Transhüceyrə Nəqliyyatı

Əvvəlki bölmələr əhəmiyyətli hüceyrə funksiyalarını yerinə yetirmək üçün transporterlərin bir neçə tipinin bir yerdə necə fəaliyyət göstərməsini işıqlandırdı. Burada biz bu konsepsiyanı asimmetrik (fərqli "tərəfləri") olan və beləliklə plazma membranının biokimyəvi cəhətdən fərqlənən rayonlarına malik olan *polyarlaşmış* hüceyrələr arasındakı bir neçə növ molekul və ionların nəqlinə yönəldərək genişləndiririk. Polyarlaşmış hüceyrələrin xüsusən yaxşı-öyrənilmiş sinifi, vərəq şəkilli qatları (epiteli) əmələ gətirən, bədənin orqanlarının əksər xarici və daxili səthini örtən epiteli hüceyrələridir. (Epiteli hüceyrələri daha geniş detalları ilə Fəsil 20-də müzakirə olunur.) Əksər epiteli hüceyrələri kimi, qida maddələrinin mədə-bağırsaq traktından sorulmasında iştirak edən bağırsaq epiteli hüceyrələri iki əsas fərqli rayondan təşkil olunmuş plazma membrana malikdir: orqanizmin xaricinə baxan, **apikal** adlanan və ya yuxarı səth və orqanizmin daxilinə baxan (və ya qan-axarlarına baxan tərəf) **bazelateral** səth adlanır (bax Şəkil 20-11).

Epitel heceyrələrinin plazma membranının **sıx qovşaqlar** adlanan xüsusi rayonları apikal və bazolateral membranları ayırır və suda-həll olan çox maddələrin, amma hamısının deyil, hüceyrələr arasındakı hüceyrıxarici sahənin bir tərəfdən digər tərəfinə keçməsinə mane olur. Bu səbəbdən, çox qida maddələrinin epitel hüceyrəsi təbəqələri ilə bağırsaq lümenindən sorulması və sonda qana keçməsi *transhüceyrə daşınma* adlanan ikimərhələli proseslə baş verir: molekulların bağırsaq epiteli hüceyrələrinin apikal təırəfində olan plazma membranından keçərək import (qəbul) olunması və onların bazelateral (qana baxan) tərəfdə olan plazma membranından keçərək eksport olunması (Şəkil 11-30). Plazma membranın bağırsaq lümenlərinə baxan apikal hissəsi qidadan çoxsaylı müxtəlif həzim fermentləri vasitəsi ilə alınan şəkərləri, amin turşularını və başqa molekulları qəbul etmək üçün ixtisaslaşmışdır.



ŞƏKİL 11-30 Qlükozanın bağırsaq lümenlərindən qana transhüceyrə daşınması. Bakteriyaların səth membranında olan Na^+/K^+ ATP-aza Na^+ və K^+ qatılıq qradientini əmələ gətirir (pillə 1). K^+ ionlarının qapanmayan K^+ kanallaraı ilə hüceyrə xaricinə hərəkəti bütün plazma membranında daxili-mənfi olan membran potensialını yaradır. Həm Na^+ qatılıq qradienti həm də membran potensialı qlükozanın bağırsaq lümenindən membranın apikal səthində yerləşən iki-Na^+/bir-qlükoza simporter vasitəsi ilə sorulmasını idarə etmək üçün istifadə olunur (pillə 2); qlükoza hüceyrəni, bazolateral membranda yerləşən qlükoza yuniporteri GLUT2 ilə kataliz olunan asanlaşdırılmış diffuziya yolu ilə tərk edir (pillə 3).

Qlükoza və Amin Turşularını Epitelidən Keçərək Daşımaq Üçün Çoxsaylı Nəqliyyat Zülalları Lazımdır

Şəkil 11-30 qlükozanın bağırsaq lümenindən qana sorulmasında iştirak edən zülalları təsvir edir və epiteli hüceyrələrinin apikal və bazelateral membranlarında yerləşən müxtəlif növ zülalların çox əhəmiyyətli konsepsiyanı işıqlandırır. Bu prosesin birinci mərhələsində, apikal membranda yerləşən iki-Na^+/bir-qlükoza simporteri qlükozanı bağırsaq lümenindən epitelial

hüceyrələrinin apikal səthindən keçərək onun qatılıq qradientinə qarşı import edir. Yuxarıda qeyd olunduğu kimi, bu simporter bir qlükozanın energetik cəhətdən əlverişli olmayan daxilə hərəkəti ilə iki Na^+ ionunun energetik cəhətdən əlverişli olan daxilə hərəkətini brləşdirir (bax Şəkil 11-26). Sabit vəziyyətdə, Na^+/qlükoza simportu zamanı bağırsaq lümenindən hüceyrəyə daşınan bütün Na^+ ionları, və ya Na^+/amin turşusu simportunun, həmçinin apikal membranda da baş verən oxşar prosesi nasosla qana baxan bazelateral membrandan vururlur. Beləlikmlə, hüceyrədaxili Na^+-un aşağı qatılığı saxlanılır. Bu vurulmanı yerinə yetirən Na^+/K+ ATP-aza yalnız bağırsaq epiteli hüceyrələrinin bazelateral membranında tapılmışdır. Bu iki nəqliyyat zülalının razılaşdırılmış (koordinasiya olunmuş) fəaliyyai qlükoza və amin turşularının bağırsaqdan hüceyrələrə yuxarıya istiqamətdə hərəkətinə imkan verir. Hüceyrədən keçən bu daşınmanın birinci mərhələsi ATP-nin Na^+/K^+ ATP-aza vasitəsilə hidrolizindən alınan enerji ilə təmin olunur.

İkinci mərhələdə, apikal somporterlər vasitəsi ilə bağırsaq hüceyrələrində toplanıb qatılaşmış qlükoza və amin turşuları bazolateral membranda yuniport zülallarla qatılıq qradientlərinin azalan istiqamətində qana eksport olunurlar. Qlükoza olan halda bu daşınma GLUT2 vasitəsi ilə yerinə yetirilir (bax Şəkil 11-30). Əvəllər qeyd olunduğu kimi, bu GLUT izoformanın qlükozaya affinliyi aşağıdır, amma membranın tərəflərində qlükoza qradienti yüksələndə onun daşınmasını əhəmiyyətli dərəcədə artırır (bax Şəkil 11-4).

Bu ikimərhələli prosesin son nəticəsi Na^+ ionlarının, qlükozanın və amin turşularının bağırsaq epitelisini keçərək, bağırsaq lümenindən bağırsaq epiteli hüceyrələrinin bazolateral səthini əhatə edən hüceyrəxarici mühitə və sonda qana keçməsidir. Epitel hüceyrələri arasındakı sıx qovşaq bu molekulların geriyə, bağırsaq lümeninə diffuziyasının qarşısını alır. Duzların, qlükozanın və amin turşularının bağırsaq epitelisində transhüceyrə daşınması ilə yaranan yüksək osmotik təzyiq suyu bağırsaq lümenindən əsasən sıx qovşaqlarla bazolateral səthi əhatə edən hüceyrəxarici mühitə sorur, burada akvaporinlər əhəmiyyətli rol oynamırlar. Müəyyən mənada, duzlar, şəkərlər və amin turşuları suyu özləri ilə birgə "aparırlar".

Sadə Rehidrasiya Müalicəsi Qlükoza və Na^+ Udulmasından Yaranan Osmotik Qradientdən Asılıdır

Osmosun və bağırsaqdaxili duzların və qlükozanın udulmasının anlaşılması hər il millionlarla həyatı xilas edən sadə bir müalicənin əsasını təşkil edir, xüsusən də az inkişaf etmiş ölkələrdə. Bu ölkələrdə, vəba və başqa bağırsaq yolxucuları cavan uşaqların ölümünə aparan əsas səbəbdir. Bakteriyalar tərəfindən ifraz olunan zəhər (toksin) xloridin bağırsaq epiteli hüceyrələrində apikal səthdən lümenə ifrazını fəallaşdırır; su osmotik olaraq axır və suyun kütləvi itirilməsi nəticəsində qarınaxması (diarhia), dehidrasiya və sonda ölüm baş verir. Müalicə yalnız bakteriyaların antibiotiklərlə ölümünü tələb etmir, həmçinin r*ehidrasiyanı* – qandan və başqa toxumalardan itirilmiş suyun bərpa olunmasını tələb edir.

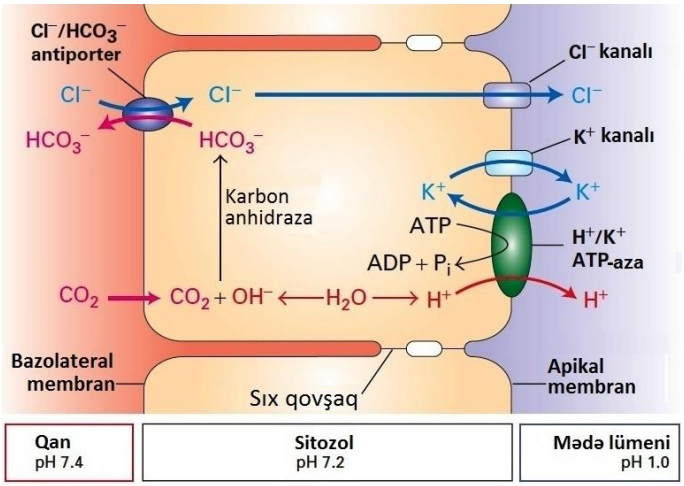
Sadəcə olaraq su içmək buna kömək etmir, çünki o daxil olan kimi dərhal mədə-bağırsaq traktından atılır. Amma, bizim indicə öyrəndiyimiz kimi, qlükoza və Na^+-un bağırsaq epitelisindən koordinasiya olunan daşınması transepiteli osmotik qradienti yaradır, sonda suyun bağırsaq lümenindən epiteli hüceyrə qatı ilə qana keçməsinə məcbur edir. Beləliklə də bu xəstəliyə tutulmuş uşaqlara şəkər və duz məhlulu (amma, ayrıca duz və şəkər məhlulu deyil) içirdilir, yaranan yüksək transepitelial natrium və şəkər daşınması və uyğun olaraq qana suyun bağırsaq lümenindən artan osmotik axını baş verir, bu da rehidrasiyaya səbəb olur. Oxşar şəkər-duz məhlulları, atletlərin şəkər və suyu bədənə tez və səmərəli qəbul etmək üçün istifadə etdikləri populyar içkilərin əsasını təşkil edir.

Parietal Hüceyrələr Sitozolun pH-ı Neytral Saxlamaqla Mədənin Tərkibini Turşulaşdırır

Məməlilərin mədəsi 0.1 M xlorid turşusu (HCl) məhluluna malikdir. Bu güclü turş mühit udulmuş çoxsaylı patogenləri məhv edir və udulmuş çox zülalları denaturasiya edir, beləliklə onlar turş mühitdə fəaliyyət göstərərn proteolitik fermentlər (məsələn, pepsin) vasitəsi ilə parçalanır. Xlorid turşusu mədənin iç qatında olan *parietal hüceyrələr* (həmçinin *oksintik hüceyrələr* kimi məlumdur) adlanan xüsusi epiteli hüceyrələri tərəfindən mədəyə ifraz olunur. Bu hüceyrələr apikal membranlarda, mədə lümeninə tərəf baxan H^+/K^+ ATP-azaya malikdirlər və million dəfə yüksək H^+ qatılığı qradientini yaradırlar: sitozolda neytral pH~7.2-ə qarşı mədə lümenində pH~1.0 olur. Bu nəqliyyat zülalı P-sinif ATP-aza ilə işləyən ion nasosudur, quruluşuna və fəaliyyətinə görə əvvəldə müzakirə olunan plazma membranı Na^+/K^+-ATP-azaya oxşardır. Parietal hüceyrələrdə çox sayda mitoxondrilər H^+/K^+ ATP-azaların istifadəsi üçün külli miqdarda ATP yaradırlar.

Əgər parietal hüceyrələr K^+-la mübadilədə sadəcə H^+ ionlarını eksport edirlərsə protonun itirilməsi sitozolda OH^- ionlarının qatılığının artmasına səbəb olmalıdır, beləliklə, pH nəzərə çarpacaq dərəcədə qalxmalıdır. (Xatırladaq ki, $[H^+]\times[OH^-]$ həmişə konstantdır, 10^{-14} M^2.) Parietal hüceyrələr, "artıq" ("izafi") OH^- ionlarını sitozoldan qana export etmək üçün bazolateral membranda Cl^-/HCO_3^- antiporterlərini istifadə edərək mədə lümeninin turşulaşdırılması ilə birlikdə sitozolda pH-ın belə yüksəlməsindən yayınırlar. Əvvəldə qeyd olunduğu kimi, bu anion antiporter sitozolun yüksək pH-ı ilə fəallaşır.

Parietal hüceyrələrin mədə lümenini turşulaşdırdığı ümumi proses Şəkil 11-31-də verilmşdir. Karbon anhidraza ilə kataliz olunan reaksiyada, sitozolda OH^--ın artığı qandan diffuziya ilə daxil olan CO_2 ilə birləşərək HCO3$^-$ əmələ gətirir. Bazolateral anion Cl^-/HCO_3^- antiporteri ilə kataliz olunan bu bikarbonat ionu Cl^- ionu ilə mübadilədə bazolateral membrandan keçərək (sonda qan hüceyrələrinə) eksport olunur. Sonra Cl^- ionları apikal membrandakı Cl^- kanalları ilə çıxır və mədə lümeninə daxil olur. Elektroneytrallığı qoruyub saxlamaq üçün apikal membrandan keçərək mədə lümeninə girən hər Cl^- ionu ayrıca K^+ kanalı ilə xaricə hərəkət edən K^+ ionu ilə müşayət olunur. Bu münvalla, H^+/K^+ ATP-aza ilə daxilə vurulan K^+ ionlarının artıq hissəsi mədə lümeninə qayıdır, beləliklə K^+ normal hüceyrədaxili qatılığı saxlanılır. Xalis nəticə bərabər miqdarda H^+ və Cl^- ionlarının (daha doğrusu HCl) mədə lümeninə ifraz olunmasıdır, bu zaman sitozolun pH-ı neytral qalır və HCO_3^- kimi OH^- ionlarının artıq miqdarı pH-ın dəyişilməsinin minimal olduğu qana daşınır.



ŞƏKİL 11-31 Mədə lümenininin mədənin daxili üz qatında olan parietal hüceyrələrlə tuşulaşması. Parietal hüceyrələin apikal membranı H^+/K^+ ATP-azalara (P-sinif nasos), həmçinin Cl^- və K^+ kanalları zülallarına malikdir. Qeyd edək ki, apikal membranda tsiklik K^+ daşınması: K^+ ionlarının H^+/K^+ ATP-aza ilə daxilə vurulmasından və K^+ kanalı ilə çıxarılmasından ibarətdir. Bazolateral membran HCO_3^- və Cl^- ionlarını mübadilə edən anion antiporterlərə malikdir. Bu dörd müxtəlif nəqliyyat zülallarının və karbon anhidrazanın birləşmiş əməliyyatı mədə lümünini turşulaşdırır, halbuki bu zaman sitozolda neytral pH saxlanılır.

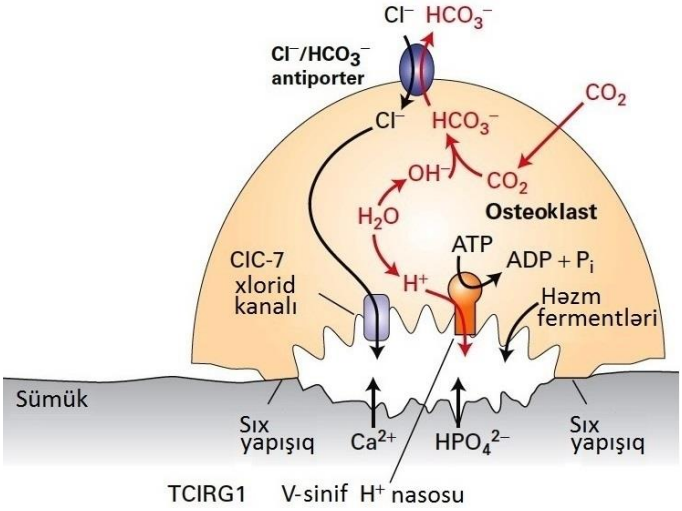
Sümüyün Rezorpsiyası V-Sinif Proton Nasoslarının və Xlorid Kanalı Zülallarının Koordinasiya Olunmuş Fəaliyyətini Tələb Edir

Məməlilərdə xaliis sümük böyüməsi cinsi yetkinliyə çatdıqdan dərhal sonra dayanır, amma sonra, sümük pozulması (rezorpsiyası) və yenidən toplanması (sümük formalaşması) kimi tarazlaşmış, yüksək dərəcəd dinamik proses yetkinlik dövründə də davam edir. Bu cürə davam edən sümük remodelinqi zədələnmiş sümüklərin bərpa olunmasına və kalsiumun, fosfatın və başqa ionların bədəndə başqa nahiyələrdə istifadə etmək üçün minerallaşmış sümükdən qana buraxılmasına imkan verir.

Sümk-həlledən hüceyrələr – *Osteoklastlar* bədəni yoluxmalardan qorumaq roluna görə yaxşı məlum olan mikrofaqların bir növüdür. Osteoklastlar polyarlaşmış hüceyrələr olub, öz aralarında və sümükdə xüsusiləşmiş, çox sıx yapışmanı əmələ gətirirlər və qapalı hüceyrəxarici sahəni yaradırlar Şəkil 11-32). Sonra yapışqan osteoklast bu sahəyə sümüyün qeyri üzvi komponentlərini Ca^{2+} və fosfati və onun zülal komponentlərini həll edən HCl və proteazalardan ibarət olan aşındırıcı qatışığı irfaz edir. HCl ifrazının mexanizmi mədəninm həlledici mədə şirəsini yaratmaq üçün istifadə etdiyi metodla oxşardır (bax Şəkil 11-31). Mədə HCl ifrazında olduğu kimi, karbon anhidraza və anion antiporter osteoklast fəaliyyəti üçün də çox əhəmiyyətlidir.

Osteoklastlar H^+ ionlarını sümüyə-baxan sahəyə eksport etmək üçün, mədə epitel hüceyrələrinin istifadə etdiyi P-sinif ATP-ilə-işləyən H^+/K^+ nasosundan deyil V-tipli proton nasosundan istifadə edirlər.

Nadir irsi xəstəlik, sümük toxumasının yüksək dərəvədə sıxlığı ilə qeyd olunan *osteopetrozis* qeyri normal aşağı sümük rezorbsiyasının nəticəsidir. Çox xəstələrdə fəaliyyəti osteoplastla sümük arasında boşluğu turşulaşdırmaq üçün tələb olunan V-sinif proton nasosunun subvahidi TCIRG1-i kodlaşdıran gendə mutasiya baş verir. Digər xəstəlkərdə sümük yaxınlığındakı boşluğa baxan osteoklast plazma membranı domenində yerləişən xlorid kanalını kodlaşdıran ClC-7 genində fəalsızlaşdırıcı mutasiya baş verir. Lizosomlarla olduğu kimi (bax Şəkil 11-14), xlorid kanalı olmayan halda proton nasosu onu əhatə edən hüceyrəxarici mühiti turşlaşdıra bilmir və ona görə də sümük rezorpsiyası qüsurlu olur.



ŞƏKİL 11-32 Sümüyün polyarlaşmış osteoklast hüceyrələrlə həll edilməsi V-sinif proton nasoslarını və ClC-7 xlorid kanal zülalını tələb edir. Osteoklast plazma membranı membran halqası ilə sümük səthi arasında möhkəm sıxlaşma ilə iki domenə bölünür. Sümüyə tərəf baxan membran domeni V-sinif proton nasoslarına və ClC-7 Cl^- kanallarına malikdir. Əks tərəfdəki membarn domeni HCO_3^- və Cl^- ionlarını mübadilə edən anion antiporterlərə malikdir. Bu üç nəqliyyat zülallarının və karbon anhidrazanın birgə əməliyyatı əhatə edən mühiti turşulaşdırır və sümüyün əriməsinə (rezorpsiyasına) imkan verir, halbuki bu zaman sitozolda neytral pH saxlanılır. ClC-7 müzakirəsi üçün R. Planells-Cases and T. Jentsch, 2009, *Biochem.Biophys.Acta* **1792**:173 bax.

11.6 BÖLMƏNİN ƏSAS KONSEPSİYASI

Transhüceyrə Nəqliyyatı

- Epiteli hüceyrələrinin apikal və bazolateral plazma membranı müxtəlif nəqliyyat zülallarına malikdirlər və kifayət qədər fərqli nəqliyyat proseslərini yerinə yetirirlər.
- Bağırsaq epiteli hüceyrələrində Na^+-əlaqəli simporterin apikal membranda və Na^+/K^+ ATP-azaların və yuniporterlərin bazolateral membranda koordinasiya olunan fəaliyyəti amin turşularının və qlükozanın bağırsaq lümenindən qana transhüceyrə daşınmasını həyata keçirir (bax Şəkil 11-30).
- Duzların, qlükozanın və amin turşuılarının bağırsaq epitelisindən keçən transhüceyrə daşınmasından yaranan

yüksək osmotik təzyiq suyu bağırsaq lümenindən bədənə sorur, bu hadisə şəkər-duz məhlulundan istifadə etməklə rehidrasiya müalicəsinin əsasını təşkil edir.
- Karbon-anhidraza və dörd müxtəlif nəqliyyat zülallının birgə fəaliyyəti mədənin daxili üz qatında parietal hüceyrələrə HCl-i lümenə ifraz etməsinə imkan verir və bu hüceyrələrin sitozolunda pH neytrala yaxın saxlanılır (bax Şəkil 11-31).
- Sümük əriməsi (rezorpsiyası) osteoklastlarda V-sinif proton nasosunun və ClC-7 xlorid kanal zülalının koordinasiya olunan fəaliyyətini tələb edir (Şəkil 11-32).

Açar Sözlər

ABC superailəsi
antiportr
akvaporinlər
ATP-ilə-işləyən nasos
daşıyıcı (transporter)
elektrokimyəvi qradient
fəal daşınma
flippaza
F-sinif nasos
GLUT zülallar
hipertonik
hipotonik
asanlaşdırılmış nəqliyyat
izotonik
kotransport
qapanan kanal
membran potensialı
Na^+/K^+ ATP-aza
yamaq-sıxac (patch clamping)
P-sinif nasos
sadə diffuziya
sakitlikdə olan K^+ kanalı
sakitlikdə olan membran potensialı
sarkoplazma şəbəkəsi
sıx qovşaq
simport
transhüceyrə daşınma
V-sinif nasoslar
yuniport

Konsepsiyalara baxış

1. Azot oksidi (NO), lipiddə həll ola bilməsinə görə O_2 və CO_2 kimi qaz molekuludur. Arteriyaların endotelial hüceyrə qatı NO-ni ətrafdakı saya əzələ hüceyrələrini boşaldan və nəticədə qanın axmasını artıran siqnal kimi istifadə edir. Hansı mexanizm və ya mexanizmlər NO-ni endotelial hüceyrələrin sitoplazmasında istehsal olunduqları yerdən onların təsir edəcəyi saya əzələlərin sitoplazmasına daşımalıdır?
2. Asetat turşusu (pK_a 4.75 olan zəif turşu) və etanol hər ikisi iki karbondan hidrogendən və oksigendən təşkil olunublar və hər ikisi hüceyrəyə passiv diffuziya yolu ilə daxil olur. pH 7-də bunlardan biri membrandan digərinə nisbətən daha çox keçiricidir. Bunların hansı daha keçiricidir və nə üçün? pH 1.0 qiymətinə, tupik mədə qiymətinə qədər azaldıqda bunların hər birinin membrandan keçiriciliyinin necə dəyişildiyini tapın.
3. Yuniporterlər və ion kanalları biomembranlarda asanlaşdırılmış diffuziyanı təmin edirlər. Baxmayaraq ki, hər ikisi asanlaşdırılmış diffuziyanınn nümunələridir, ion kanalları ilə ion hərəkətinin sürəti molekulların yuniporterdə hərəkətinə nisbətən 10^4-dən 10^5-qədər daha sürətli olur. Daşınma sürətinin belə böyük fərqinin yaranmasında əsas mexaniki fərq nədir? Sərbəst enerjiyə (ΔG) göstərilən hansı töhfə daşınmanın istiqamətini müəyyən edir?
4. Üç sinif membran transport zülallarını adlandırın. Bu siniflərdən hansı birinin və ya hansıların qlükozanı və hansının bikarbonatı (HCO^{3-}) elektrokimyəvi qradientə qarşı daşımaq qabliyyətinə malik olduğunu izah edin. Qlükoza deyil, bikarbonat olan halda daşınma prosesinin ΔG-sinin iki şərti vardır. Bu iki şərt nədir və nəyə görə ikinci şərt qlükozaya tətbiq oluna bilmir? Nəyə görə birgə-daşıyıcılar (kotransporterlər) çox hallarda ikinci fəal daşıyıcılara (transporterlərə) nümunə hesab edilir?
5. H^+ ionu H_2O molekuluna nisbətən kiçikdir və üç-karbonlu spirt qliserin molekulu daha da böyükdür. Hər ikisi asanlıqla suda həll olur. Həyə görə bəzi akvaporinlər qliserini daşıya bildikləri halda H^+-i heç biri daşımır?
6. Eukariotların plazma membranında tapılan GLUT1 yuniporterlərin klassik nümunəsidir.
   a. GLUT1-in həqiqətən qalaktoza- və ya mannoza-spesifik deyil qlükoza-spesifik importer olduğunu təmin edən eksperimentlər dəstini dizayn et.
   b. Qlükoza 6-karbonlu şəkərdir, riboza isə 5-karbonlu şəkərdir. Belə oxşar ölçülərinə baxmayaraq riboza GLUT1-lə səmərəli şəkildə daşınmır. Bu necə izah oluna bilər?
   c. Qanda şəkərin miqdarının 5 mM-dan 2.8 mM-a və ya daha aşağı düşməsi özünüitirməyə və bayılmağa səbəb olur. Bu düşmənin, qlükzanın GLUT1 ekspressiya edən hüceyrələrə daşınmasına təsirini hesablayın.
   d. Qara ciyər və əzələ hüceyrələri V_{max} dəyişmədən qlükozanın udulmasını necə artırırlar?
   e. GLUT1 ekspressiya edən şiş hüceyrələri çox hallrda qlükozanın daşınmasında eyni tipli normal hüceyrələrə nisbətən daha yüksək V_{max} malik olurlar. Bu hüceyrələr V_{max} necə artıra bildilər?
   f. Piy və əzələ hüceyrələri insulin siqnalına cavab olaraq qlükozanın udulması üçün V_{max} modullaşdırırlar. Necə?
7. İon və molekulların fəal daşınmasını həyata keçirən ATP-ilə-işləyən dörd sinif nasosları adlandırın. Bu siniflərdən hansının yalnız ionları daşıdığını və hansının əsasən kiçik üzvi molekulları daşıdığını qeyd edin. ATP-ilə-işləyən bu nasosların bir sinifinin ilk aşkar olunması təbii substratın daşınmasından deyil xərçəngə qarşı kimyəvi terapiyada dərman kimi istifadə olunan sintetik substratın tədqiqatlardan alınmışdır. Tədqiqatçılar indi bu xüsiusi sinif ATP-ilə-işləyən nasosların təbii substratlarının ümumi nümunəsi kimi nəyi hesab edirlər?

8. Nəyə görə P sinif ion nasosu mexanizminə qoşulmuş ATP → ADP + Pi reaksiyasının birbaşa fosfoanhidrid rabitəsinin hidrolizinə cəlb olunmadığını izah edin.
9. Normal fəaliyyət göstərməsi üçün Ca^{2+} qatılığının sürətli dəyişilməsini tələb edən hüceyrələrdə sitozol Ca^{2+} qatılığının qalxmasına nəzarətin mənfi geriyə əlaqə mexanizmini təsvir edin. Kalmodulinin fəallığını ingibirləşdirən dərmanlar sitoplazmatik Ca^{2+} qatılığının bu mexanizmlə tənzimlənməsinə necə təsir edəcək? Məsələn, bunun skelet əzələ hüceyrələrinin fəaliyyətinə təsiri necə olmalıdır?
10. Mədə turşusu ifrazını ingibirləşdirən müəyyən proton nasosu ingibitorları bugün dünyada geniş satılan dərmanlar sırasına daxildirlər. Bu tip dərman hansı nasosu ingibirləşdirir və bu nasos harada yerləşir?
11. Heyvan hüceyrələrinin membran potensialı geniş şəkildə sakitlikdə olan K^+ kanalından asılıdır, amma bitkilərdə yox. Bu kanallar sakitlikdə olan potensiala necə kömək edir? Nəyə görə bu kanallar qapanmayan kanallar hesab edilir? Bu kanallar, K^+ ionlarından daha kiçik olan Na^+ ionlarına qarşı K^+ selektivliyinə necə nail olurlar?
12. Yamaq-sıxac (patch clamping) fərdi ion kanallarının keçiricilik xassəsini ölçmək üçün istifadə oluna bilər. Ehtimal olunan K^+ kanalını kodlaşdıran genin doğrudanda K^+ kanalını ya Na^+ kanalını kodlaşdırıdğını təyin etmək üçün yamaq-sıxacın necə istifadə oluna biləcəyini təsvir et.
13. Bitkilər vakuol membranında proton elektrokimyəvi qradientindən istifadə edərək orqanoiddə duzların və şəkərlərin toplanmasını kücəlndirirlər. Bu toplanma vakuolda hipertonik vəziyyəti yaradır. Nəyə görə bu, bitki hüceyrələrinin şişməsi və partlaması ilə nəticələnmir? Hətta izotonik şəraitdə belə, heyvan hüceyrələrinə ionların zəif axını baş verir. Plazma membranının Na^+/K^+ ATP-azası heyvan hüceyrələrinin izotonik şərait altında osmotik lizisdən yan keçməsini necə mümkün edir?
14. Bakterial iki-Na+/bir-leysin simporterində, başqa ionların, xüsusən də K^+ ionlarının birləşmədiyini əmin edən birləşmiş Na^+ ionları barədə əsas fərqləndirici xüsusiyyət nədən ibarətdir?
15. Kiçik bağırsağın iç qatını əmələ gətirən hüceyrələrin qlükozanı import etdiyi simport prosesini təsvir edin. Daşınmada hansı ion məsuldur və hansı iki xüsusi xassə bu ionların plazma membranından keçən energetik cəhətdən əlverişli hərəkətinə kömək edir?
16. Bağırsaq epitelisində qlükozanın bir tərəfdən digər tərəfə keçməsi transhüceyrə daşınmasının əsas nümunəsidir. Na^+/K^+ ATP-aza bu prosesi necə təmin edir? Nəyə görə sıx qovşaqlar bu proses üçün əhəmiyyətlidir? Nəyə görə daşıyıcıların yerləşməsi xüsusən də apikal və bazelateral membranda transhüceyrə daşınması üçün həlledici vacibdir? İdman içkiləri kimi rehidrasiya əlavələrində duz və şəkər vardır. Nəyə görə bunların hər ikisi rehidrasiya üçün əhəmiyyətlidir?

İstinadlar

Qlükoza və Suyun Asanlaşdırılmış Daşınması
Chen, L. Q., et al. 2015. Transport of sugars. *Annu. Rev. Biochem.* **84**:865–894.
Deng, D., et al. N. 2014. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature* **510**:121–126.
Gonen, T., and T. Walz. 2006. The structure of aquaporins. *Quart. Rev. Biophys.* **39**:361–396.

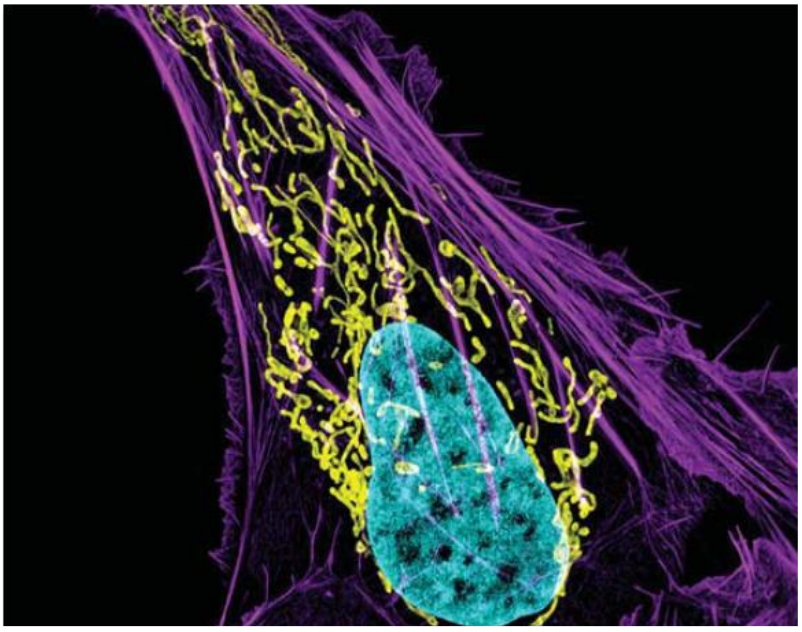
ATP-ilə-İşləyən Nasoslar və Hüceyrədaxili İon Mühiti
Aller, S., et al. 2009. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* **323**: 1718–1722.
Oldham, M. L., A. L. Davidson, and J. Chen. 2008. Structural insights into ABC transporter mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**:726–733.
Penmatsa, A., and E. Gouaux. 2014. How LeuT shapes our understanding of the mechanisms of sodium-coupled neurotransmitter transporters. *J. Physiol.* **592**:863–869.
Ramsey, B. W., et al. 2011. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N. Engl. J. Med.* **365**:1663–1672.
Shinoda, T., et al. 2009. Crystal structure of the sodium–potassium pump at 2.4 A resolution. *Nature* **459**:446–450.

Qapanmayan İon Kaalları və Sakitlikdə Olan Membran Potensialı
Gouaux, E., and R. Mackinnon. 2005. Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* **310**:1461–1465.
Hibino, H., et al. 2010. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol. Rev.* **90**:291–366.
Hille, B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3d ed. Sinauer Associates.

Simporter və Antiporterlərlə Birgə Daşınma
Alper, S. L. 2009. Molecular physiology and genetics of Na^+-independent SLC4 anion exchangers. *J. Exp. Biol.* **212**:1672–1683.
Gao, X., et al. 2009. Structure and mechanism of an amino acid antiporter. *Science* **324**:1565–1568.
Krishnamurthy, H., C. L. Piscitelli, and E. Gouaux. 2009. Unlocking the molecular secrets of sodium-coupled transporters. *Nature* **459**:347–355.
Wright, E. M. 2004. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflug. Arch.* **447**:510–518.

Transhüceyrə Daşınması
Anderson, J. M., and C. M. Van Itallie. 2009. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**:a002584.
Rao, M. 2004. Oral rehydration therapy: new explanations for an old remedy. *Annu. Rev. Physiol.* **66**:385–417.
Sobacchi, C., et al. 2013. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nat. Rev. Endocrinol.* **9**:522–536.

Yeni Perspektivlər
Liao, M., et al. 2014. Single particle electron cryo-microscopy of a mammalian ion channel. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **27**:1–7.
Stansfeld, P. J. and M. S. P. Sansom. 2011. Molecular simulation approaches to membrane proteins. *Structure* **19**:1562–1572.
Wisedchaisri, G., S. L. Reichow, and T. Gonen. 2011. Advances in structural and functional analysis of membrane proteins by electron crystallography. *Structure* **19**:1381–1393.



Fluoressensiya mikrofotosu insanın sümük xərçəngi (osteosarkoma) hüceyrəsində nüvə DNT-si (akva) və aktin sitoskelet liflərlə (bənövşəyi) yanaşı mitoxondrinin sarı boruşəkilli şəbəkəsini göstərir. [Dylan Burnette and Jennifer Lippincott·Schwarts.]

FƏSİL

12

Hüceyrə Energetikası

Hüceyrənin inkişafı və bölünməsindən ürəyin döyünməsinə qədər, düşüncələrimizin əsasında duran neyronların elektrik fəallığına qədər həyat həmişə enerji tələb edir. Enerji iş görmək qabliyyəti kimi müəyyən olunur və hüceyrə səviyyəsində bu işə keçiricilik və çoxsaylı kimyəvi reaksiyaların və nəqliyyat proseslərinin tənzimlənməsi, inkişaf və bölünmə, yüksək dərəcədə mütəşəkkil quruluşun yaradılması və saxlanılması, həmçinin başqa hüceyrələrlə qarşılıqlı əlaqələr daxildir. Bu fəsildə hüceyrələrin günəş işığından və ya kimyəvi qida maddələrindən enerji mənbəyi kimi istifadə etməsinin molekulyar mexanizmləri təsvir edilir, hüceyrələrin bu xarici enerji mənbələrini bioloji cəhətdən universal, hüceyrədaxili, kimyəvi enerji daşıyıcısı **adenozin trifosfata** və ya **ATP**-yə (Şəkil 12-1) necə çevirdiyinə xüsusi diqqət yetrilir. ATP bütün növ orqanizmlərdə tapılıb və yəqin ki, ilkin həyat formalarında da mövcud olub, kimyəvi yolla qeyri-üzvi fosfatın (HPO_4^{2-}, qısaca olaraq P_i kimi işarə olunur) adenozin difosdata və ya ADP-yə əlavə olunması ilə yaranır, bu prosesə fosforlaşma deyilir. Hüceyrələr ATP-yə birləşmiş terminal fosfoanhidrid rabitəsinin hidrolizindən ayrılan enerjidən (bax Şəkil 2-31) energetik cəhətdən əlverişli olmayan çoxsaylı prosesləri təmin etmək üçün istifadə edirlər. Buna aid misallara, amin turşularından zülalların və nukleotidlərdən nuklein turşularının sintezi (bax Fəsil 4), ATP ilə işləyən nasoslarla molekulların qatılıq qradientinə qarşı daşınması (bax Fəsil 11), əzələlərin dartılması (bax Fəsil 17) və kirpiciklərin döyünməsi (bax Fəsil 18) daxildir. Hüceyrə energetikasının əsas mövzusu zülalların bir prosesdən (məsələn ATP hidrolizindən) buraxılan enerjini termodinamik cəhətdən əlverişsiz olan başqa bir prosesin (məsələn, molekulların membrandan keçərək daşınması) idarə olunmasında istifadə etməsi və ya "birləşdirməsi"dir.

ATP-nin ADP-dən sintezini aparmaq üçün enerji (ΔG=7.3 kkal/mol) əsasən iki mənbədən alınır: qida maddələrində olan kimyəvi birləşmə enerjisi və günəş işığının enerjisi (Şəkil 12-1). Bu enerji mənbələrnin ATP-yə çevrilməsinə cavabdeh olan bu iki əsas proses **aerob oksidləşmə** (**aerob tənəffüs** kimi də adlandırılır) demək olar ki, bütün eukaryot hüceyrələrin mitoxondrilərində baş verir (Şəkil 12-1, *yuxarıda*) və **fotosintezdir**, bu da bitkilərin yalnız yarpaq hüceyrələrində xloroplastlarda (Şəkil 12-1 *aşağıda*), həmçinin yosunlar və sianobakteriyalar kimi bəzi birhüceyrəli orqanizmlərdə baş verir. İki əlavə proses, qlikoliz və limon turşusu tsikli də (Şəkil 12-1 *yuxarıda*), həm bitki, həm də heyvan hüceyrələrində ATP-nin bilavasitə və ya dolayı yolla mənbələridirlər.

QISA İCMAL

12.1 Qlükozadan Enerjini Toplamağın Birinci Mərhələsi: Qlikoliz

12.2 Mitoxondrinin quruluşu və fəaliyyəti

12.3 Limon Turşusu Tsikli və Yağ Turşusu Oksidləşməsi

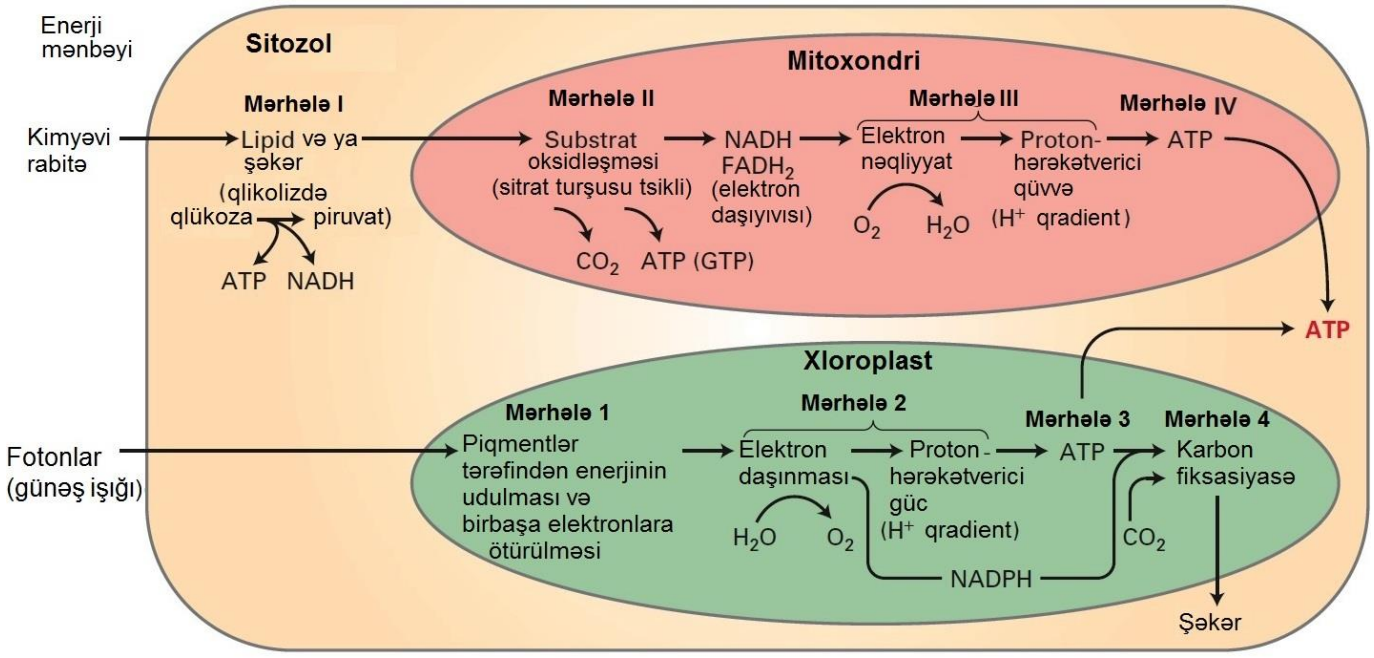
12.4 Elektron-Nəqliyyat Zənciri və Proton-Hərəkətverici Quvvənin Yaranması

12.5 Proton-Hərəkətverici Qüvvənin ATP sintezinə Qoşulması

12.6 Fotosintez və İşıq-Udan Piqmentlər

12.7 Fotosistemlərin Molekulyar Analizi

12.8 Fotosintez Zamanı CO_2 Metabolizmi



ŞƏKİL 12-1 Aerob oksidləşməyə və fotosintezə ümumi baxış. Eukaryot hüceyrələr xarici enerji mənbələrini ATP-yə çevirmək üçün iki fundamental mexanizmdən istifadə edirlər. (*Yuxarıda*) Aerob oksidləşmədə "yanacaq" molekulları (əsasən şəkərlər və yağ turşuları) sitozolda ilkin prosessinqdən keçir, məsələn qlükoza parçalanaraq piruvata (piroüzüm turşusuna) çevrilir (**I mərhələ**), sonra mitoxondriyə keçirilir və orada O_2 ilə oksidləşərək karbon iki oksidə və suya çevrilir (**II** və **III mərhələlər**) və ATP yaranır (**IV mərhələ**). (*Aşağıda*) Xloroplastlarda baş verən fotosintez zamanı işığın şüalanma (radiant) enerjisi xüsusi piqmentlər tərəfindən udulur (**mərhələ 1**); udulmuş işıq həm suyun O_2-nə oksidləşməsinə və ATP sintezi (**mərhələ 3**) üçün şəraitin yaradılmasına (**mərhələ 2**), həm də CO_2-dən karbohidratların sintezinə (karbon fiksasiyası, **mərhələ 4**) istifadə olunur. Hər iki mexanizmə reduksiya olunmuş yüksək enerji daşıyıcılarının (NADH, NADPH və FADH) istehsalı və elektronların xüsusi membranlarda elektron nəqliyyat zəncirində elektrik potensialı qradientinin azalan istiqamətində hərəkəti daxildir. Bu elektronlardan buraxılan enerji proton elektrokimyəvi qradient kimi (proton-hərəkətverici qüvvəsi) tutulur və sonra ATP sintezini həyata keçirmək üçün istifadə olunur. Bakteriyalar analoji proseslərdən istifadə edirlər.

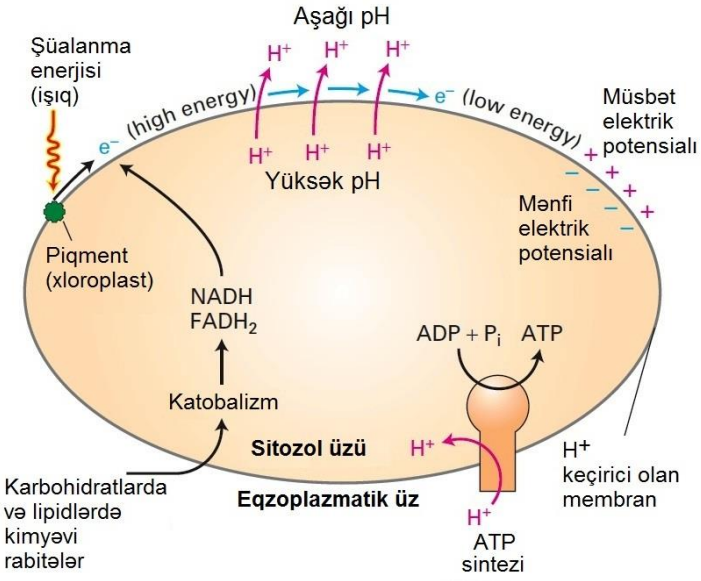
Aerob oksidləşmədə şəkərlərin (karbiohidratların) və yağ turşularının (karbohidrogenlərin) parçalanma məhsulları – hər ikisi heyvanlarda qidanın həzmindən alınır – O_2 ilə oksidləşməklə karbon iki oksidə və suya (H_2O) çevrilir. Bu ümumi reaksiyadan ayrılan enerji ATP-də fosfoanhidrid rabitələrində kimyəvi enerjiyə ötürülür. Bu proses, odunun (karbohidratların) və ya neftin (karbohidrogenlərin) yandırılması ilə sobada istiliyin yaranmasına və ya avtomobildə mühərrikin hərəkətə gəlməsinə analojidir, hər ikisi CO_2 və suyu yaratmaq üçün O_2 istifadə edir. Əsas fərq ondan ibarətdir ki, hüceyrələr ümumi reaksiyanı çoxsaylı aralıq mərhələlərə bölür və istənilən verilmiş mərhələdə ayrılan enerjinin miqdarı – məsələn, ATP-də və ya növbəti aralıq mərhələdə olduğu kimi – saxlanıla bilən enerjinin miqdarı ilə uyğun gəlir. Əgər belə yaxın uyğunluq olmazsa, artıq buraxılan enerji istilik kimi itirilməli idi (bu qeyri səmərəli olardı) və ya ATP kimi enerji saxlayan molekulların yaradılması üçün kifayət qədər enerji buraxılmazdı və ya prosesin növbəti mərhələsinə keçmək mümkün olmazdı (bu da faydasız olardı).

Fotosintez zamanı işığın şüalanma enerjisi xlorofil kimi piqmentlər tərəfindən udularaq ATP və karbohidratların – əsasən saxarozanın və nişastanın yaradılması üçün istifadə edilir. CO_2 yaratmaq üçün karbohidratlardan və O_2-dən istifadə edən aerob oksidləşmədən fərqli olaraq, fotosintez son məhsul kimi O_2 və karbohidratları yaratmaq üçün substrat kimi CO_2 istifadə edir.

Mitoxondrilərdə olan aerob oksidləşmə ilə xloroplastlarda baş verən fotosintez arasındakı bu qarşılıqlı əlaqələr fotosintetik və qeyri fotosintetik orqanizmlər arasındakı dərin simbiotik əlaqələrin əsasını təşkil edir. Fotosintez zamanı yaranan oksigen virtual olaraq havada olan bütün oksigünün mənbəyidir və istehsal olunan karbohidratlar virtual olaraq yer üzündə olan bütün qeyri fotosintetik orqanizmlərin əsas enerji mənbəyidir. (İstisna yalnız okeanın dibindəki dərinliklərində hidrotermal çatlarda yaşayan bakterialar və onlarla qidalanan orqanizmlərdir, onlar CO_2-nı karbohidratlara çevirmək üçün enerjini okean dibindəki çatlarda buraxılan geoloji proseslərdə yaranan reduksiya olunmuş qeyri-üzvi komponentlərin oksidləşməsindən alırlar.)

İlk baxışdan, belə görünə bilər ki, fotosintez və aerob oksidləşmənin molekulyar mexanizmləri, hər ikisinin ATP istehsal etməsi faktını nəzərə almasaq çox az ümumi oxşarlığa malikdirlər. Amma, hüceyrə biologiyasının inqilabı kəşfi müəyyən etdi ki, bakteriyalar, mitoxondrilər, və xloroplastlar hamısı ADP və P_i-dan ATP yaratmaq üçün **kemiosmozis** adlanan eyni mexanizmdən istifadə edirlər. Kemiosmozisdə (bu həmçinin *kemiosmotik cütləşmə* də adlanır) birinci membranda elektronların **elektron nəqliyyat zənciri** vasitəsi ilə elektrik potensialı qradientinin azalan istiqamətində hərəkəti nəticəsində ayrılan enerji ilə idarə olunan proton elektrokimyəvi qradient yaranır. Elektrokimyəvi qradientdə saxlanılan **proton-hərəkətverici-güvvəsi** adlanan bu enerji sonra ATP sintezini

təmin etmək üçün (Şəkil 12-2) və ya başqa enerji-tələb edən proseslərdə istifadə olunur. Protonlar ATP sintaza adlanan ATP sintez edən ferment ilə öz elektrokimyəvi qradienti üzrə aşağıya doğru hərəkət etdikcə ADP və Pi-dan ATP sintez olunur, 11-ci fəsildə müzakirə olunan ATP-ilə-təmin olunan ion nasoslarının əksinə gedən prosesi baş verir. Bu fəsildə, biz iki prosesin molekulyar mexanizmlərini tədqiq edirik, birinci diqqətimizi aerob oksidləşməyə, sonra isə fotosintezə yönəldirik.



ŞƏKİL 12-2 Proton-hərəkətverici qüvvəsi ATP sintezini təmin edir. Ümumilikdə *proton-hərəkətverici qüvvə* adlanan transmembran proton qatılığı və elektrik qradienti (voltaj) eukaryotlarda və prokariotlatrda (bakterialarda) aerob oksidləşmə və fotosintez zamanı yaranır. İşığın piqmentlər (xlorofiol) tərəfindən udulması ilə yaranan yüksək-enerjili elekltronlar və şəkərlərin və lipidlərin katobalizmi zamanı rediksiya olunmuş şəkildə saxlanılan elektron daşıyıcılar (məsələn, NADH, $FADH_2$) elektron nəqliyyat-zənciri (mavi oxlar) ilə aşağıya doğru keçir və prosesin gedişi boyu enerji buraxırlar. Buraxılan enerji protonları membrandan (qırmızı oxlar) nasos kimi vuraraq proton-hərəkətverici qüvvəsini yaratmaq üçün istifadə olunur. Kemiosmotik birləşmədə, protonun ATP sintaza vasitəsi ilə qradientlə aşağıya doğru axması nəticəsində buraxılan enerji ATP-nin sintezini həyata keçirir. Proton-hərəkətverici qüvvə, metabolitlərin membrandan keçərək onların qatılıq qradientlərinə qarşı daşınması və bakterial qamçıların fırlanması kimi başqa prosesləri də enerji ilə təmin edir.

12.1 Qlükozadan Enerji Toplamağın Birinci Pilləsi: Qlikoliz

Avtomobil mühərrikində karbohidrogen yanacaq oksidativ və partlayışşəkilli yolla mahiyyətcə bir-mərhələli mexaniki işə (porşenin hərəkətinə) və CO_2 ilə H_2O kimi məhsullara çevrilir. Bu prosess nisbətən səmərəsizdir ona görə ki, yanacaqda saxlanılan əhəmiyyətli miqdarda kimyəvi enerji istifadə olunmayan istiliyə çevrilərək atılır və əhəmiyyətli miqdarda yanacaq yalnız qismən oksidləşir və karbonlu birləşmələr şəkilində, bəzi hallarda zəhərli işlənmiş qazlar şəkilində buraxılır. Orqanizmlər yaşamaq üçün rəqabətdə, bəzən onlar üçün məhdud olan enerji mənbələrinin ekvivalent səmərəsiz proseslərlə israfçılığına imkan verə bilməzlər və ona görə də takamül prosesində yanacağı işə çevirmək üçün daha səmərəli mexanizmləri yaratmışlar. Aerob oksidləşmə kimi məlum olan bu mexanizm aşağıdakı üstünlükləri təmin edir:

- Enerji çevrilməsi prosesini bir sıra enerji-daşıyan aralıq məhsulları yaradan çoxsaylı mərhələlərə bölməklə, kimyəvi rabitə enerjisi istilik şəkilində az enerji itirməklə səmərəli şəkildə ATP sintezinə yönəldilir.
- Fərqli yanacaqlar (şəkərlər və yağ turşuları) ümumi aralıq məhsullara reduksiya olunurlar, ona görə də, sonra yanarkən və ATP sintez edərkən eyni yoldan istifadə edirlər.
- İlkin yanacaq molekulunun rabitələrində saxlanılan ümumi enerjinin miqdarı bir ATP molekulunun sintezi üçün tələb olunan (~7.3 kkal/mol) enerjidən çox olduğundan çoxsaylı ATP molekulları istehsal olunurlar.

Qida yanacaqlarının CO_2 və H_2O-ya parçalanmasından ATP istehsalının çox əhəmiyyətli xüsusiyyəti (bax Şəkil 12-1, *yuxarı*) **tənəffüs** adlanan reaksiyalar dəstinin olmasıdır, buraya *elektron-nəqliyyat-zənciri* adlanan bir sıra oksidləşmə və reduksiya reaksiyaları daxildir. Bu reaksiyaların ATP əmələ gətirmək üçün ADP-nin fosforlaşması ilə kombinasiyası oksidadtiv fosforlaşma adlanır və demək olar ki, bütün eukaryot hüceyrələrinin mitoxondrilərində baş verir. Oksigen mövcud olduqda və elektron-nəqliyyat-zənciri ilə daşınan elektronların son qəbuledicisi kimi istifadə olunduqda, qida enerjisini ATP-yə çevirən tənəffüs prosesi *aerob tənəffüs* və ya *aerob oksidləşmə* adlanır. Oksigen güclü oksidləşdirici olduğundan, aerob tənəffüs, qida enerjisinin ATP-yə çevrilməsini maksimum artırmaq üçün xüsusilə əhəmiyyətli yoldur. Oksigendən başqa bir sıra molekullar da, məsələn zəif oksidləşdirici sulfat (SO_4^{2-}) və ya nitrat (NO^{3-}) elektron nəqliyyat zəncirində elektronların son qəbuledicilərididirlər, buna **anaerob tənəffüs** deyilir. Anaerob tənəffüs bəzi prokariot orqanizmlər üçün xasdır. Hərçənd ki, bəzi istisnlar mövcuddur, məlum olan çoxhüceyrəli (metazoan) eukaryot orqanizmlərin əksəriyyəti onlara lazım olan ATP-nin əsas hissəsinin istehsalında aerob tənəffüsdən istifadıə edirlər.

Bizim aerob oksidləşmə üzrə müzakirəmizdə, biz iki əsas hüceyrə yanacağının: şəkərlərin (əsasən qlükoza) və yağ turşularının müqəddaratını izləyəcəyik. Müəyyən şərait altında, məsələn aclıq zamanı amin turşuları da bu metabolik yola girirlər. Biz əvvəlcə qlükozanın oksidləşməsinə baxacağıq, sonra isə yağ turşularına başlayacağıq.

Bir molekul qlükozanın tam aerob oksidləşməsi altı molekul CO_2 verir və ayrılan enerji 30 molekula qədər böyük miqdarda ATP molekullarının sintezinə qoşulur. Ümumi reaksiya belədir:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 + 30\ P_i^{2-} + 30\ ADP^{3-} + 30\ H^+ \rightarrow 6\ CO_2 + 30\ ATP^{4-} + 6\ H_2O$$

Eukaryotlarda qlükozanın oksidləşməsi dörd mərhələdə gedir (bax Şəkil 12-1, *yuxarıda*):

Mərhələ I: **Qlükoliz** Sitozolda hər bir 6-karbonlu qlükoza molekulu bir sıra reaksiyalar vasitəsi ilə iki üç-karbonlu piruvat (piroüzüm turşusu) molekuluna çevrilir; hər bir qlükoza molekulu üçün iki xalis ATP istehsal olunur.

Mərhələ II: **Limon turşusu tsikli** Mitoxondridə, piruvatın CO_2 qədər oksidləşməsi yüksək enerjili elektron daşıyıcıları NADH

və $FADH_2$-nin yaranması ilə birləşir, bunlar isə enerjini sonrakı istifadə etmək üçün saxlayırlar. Bu iki daşıyıcı yüksək-enerjili elektronların mənbəyi hesab edilə bilər.

Mərhələ III: **Elektron nəqliyyat zənciri** Yüksək enerjili elektronlar, ayrılan enerjini proton-hərəkətverici qüvvəsinə (H^+ qradient) çevirən membran zülalları vasitəsi ilə özlərinin elektrik potensialı qradientinin azalan istiqamətində (aşağıya) NADH və $FADH_2$-dən O_2 doğru axırlar. Bu elektronlardan buraxılan enerji protonları membrandan vuraraq qradient yaradır.

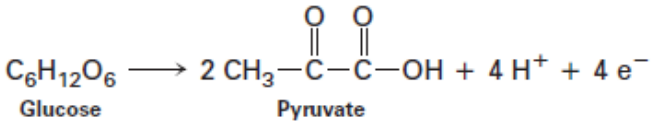
Mərhələ IV: **ATP sintezi** Protonlar öz qatılıq qradientinin və gərginlik qradientinin azalan istiqamətində aşağıya doğru mitoxondrial membrana batmış ATP sintezi fermenti ATP-sintaza vasitəsi ilə axdıqca proton-hərəkətverici qüvvə ATP sintezini təmin edir. Hər bir ilkin qlükoza molekulu üçün oksidadtiv fosforlaşma mexanizmi yolu ilə təxminən 28 əlavə ATP molekulları istehsal olunur.

Bu bölmədə biz I mərhələni: sitozolda qlükozanı piruvata parçalayan biokimyəvi yolları müzakirə edirik. Biz həmçinin bu yolların necə tənzimləndiyini və aerob və anaerob şəraitlərdə qlükozanın metabolizmini müzakirə edirik. Piruvatın mitoxondrtiyə daxil olduqdan sonrakı son müqəddaratı 12.3 Bölməsində müzakirə olunur.

Qlükoliz Zamanı (Mərhələ I) Sitozol Fermentləri Qlükozanı Piruvata Çevirirlər

Qlükozanın oksidləşməsinin birinci mərhələsi, **Qlikoliz** həm eukaryotlarda həm də prokariotlarda sitozolda baş verir, o molekulyar oksigeni (O_2) tələb etmir və beləliklə anaerob prosesdir. Qlikoliz **katobalizmə,** mürəkkəb maddələrin kiçik sadə maddələrə bioloji parçalanmasına aid olan bir misaldır. Suda həll olan, 10-a qədər fermentdən ibarət olan dəst, bir molekul qlükozanı iki molekul piruvata çevirən *qlikolitik yolu* (*glyco*, "şirin" və *lysis* "parçalama, xırdalama") təşkil edən reaksiyaları kataliz edir (Şəkil 12-3). Bu fermentlərlə yaranan bütün aralıq reaksiya məhsulları *metabolik aralıq məhsullar* adlanan, suda-həll olan, fosforlaşan birləşmələrdir. Bundan əlavə, bir molekul qlükozanı iki molekul piruvata kimyəvi çevrməklə qlikolitik yol dörd molekul ADP-ni fosforlaşdırmaqla dörd molekul ATP yaradır (reaksiya 7 və 10). ATP, fosforlaşmış metabolik aralıq məhsullardan alınan P_i-ın birbaşa ADP ilə fermentlə kataliz olunan birləşməsi nəticəsində yaranır, bu proses **substrat-səviyyəsində-fosforlaşma** adlanır (o III və IV mərhələdə ATP-ni yaradan *oksidativ fosforlaşmadan* fərqləndirmək üçün belə adlanır). Qlikolizdə proton-hərəkətverici qüvvənin istifadəsinin daxil olmadığı substrat-səviyyəsində-fosforlaşma əvvəlcədən iki ATP-dən iki fosfatın (reaksiya 1 və 3) əlavə olunmasını tələb edir. Buna, "ilkin nasos vurulma" ("pump priming") reaksiyası kimi baxıla bilər, çünki sonrakı reaksiyada daha çox enerjini bərpa etmək üçün əvvəldə bir az enerji verilir. Beləliklə, hər qlükoza molekulunun qlikolizində yalnız iki xalis ATP molekulu istehsal edilir.

Qlükozanın iki piruvata çevrilməsinin tarazlaşdırılmış kimyəvi bərabərliyi göstərir ki, dörd hidrogen atomu (dörd proton və dörd elektron) azad olur:



(Münasiblik üçün biz piruvatı burada onun ionlaşmamış formasında, piruvat turşusu şəkilində göstəririk, hərçənd ki, fizioloji pH-da o, əsasən dissosasiya olunmuş şəkildə olmalıdır.) Dörd elektronun hamısı və dörd protonun ikisi koenzimin reduksiya olunmuş forması, NADH-ı (bax Şəkil 2-33a, pillə 6) əmələ gətirmək üçün iki **nikotinamid adenin dinukleotid** (**NAD^+**) molekulunun oksidləşmiş formasına keçirilirlər.

$$2H^+ + 4\,e^- + 2\,NAD^+ \rightarrow 2\,NADH$$

Sonra biz görəcəyik ki, NADH-da və analoji elektron daşıyıcısı, koenzim **flavin adenin dinukleotidin** (**FAD**) reduksiya olunmuş forması $FADH_2$-də elektronlarla daşınan enerji (bax Şəkil 2-33b) elektron nəqliyyat zənciri vasitəsi ilə əlavə ATP istehsalı üçün istifadə edilə bilir. Qlükoza metabolizminin bu birinci mərhələsinin ümumi kimyəvi bərabərliyi belə olacaq:

$$C_2H_{12}O_6 + 2\,NAD^+ + 2\,ADP^{3-} + 2\,P_i^{2-} \rightarrow 2\,C_3H_4O_3 + 2\,NADH + 2\,ATP^{4-}$$

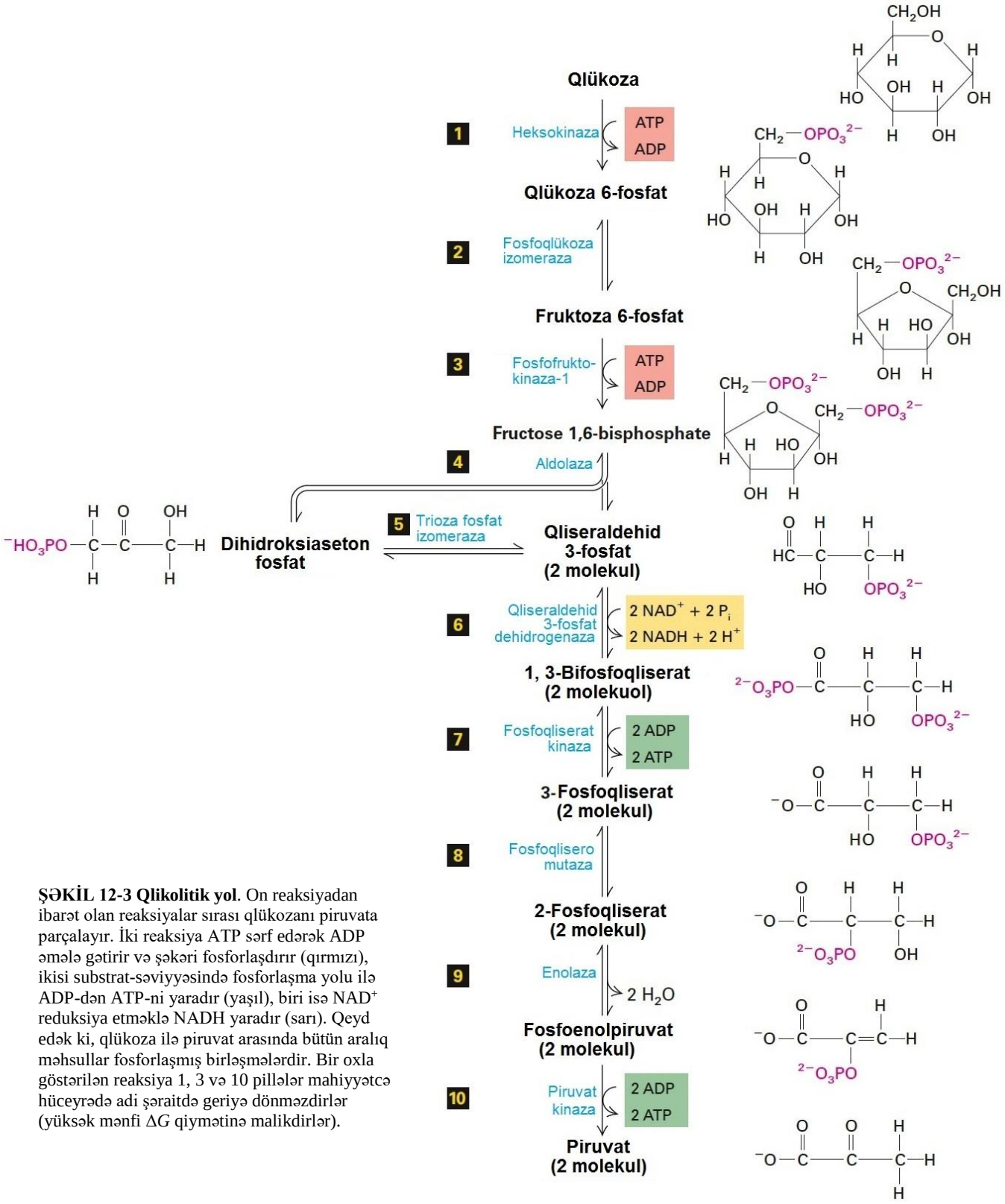
Qlikolizdən sonra, enerjinin yalnız qlükozada olan fraksiyası ayrılmış və ATP və NADH-a çevrilmişdir. Qalanları isə kovalent rabitələr şəkilində iki piruvat molekulunda tutulub saxlanılmışdır. Piruvatda olan enerjinin səmərəli şəkildə ATP-yə çevrilməsinin mümkünliyi molekulyar oksigenin mövcud olmasından asılıdır. Bizim sonra görəcəyimiz kimi, enerji çevrilməsi anaerob şəraitə nisbətən aerob şəraitdə əhəmiyyətli dərəcədə çox səmərəlidir.

Qlikolizin Sürəti Hüceyrənin ATP-yə Olan Tələbatına Görə Tənzimlənir

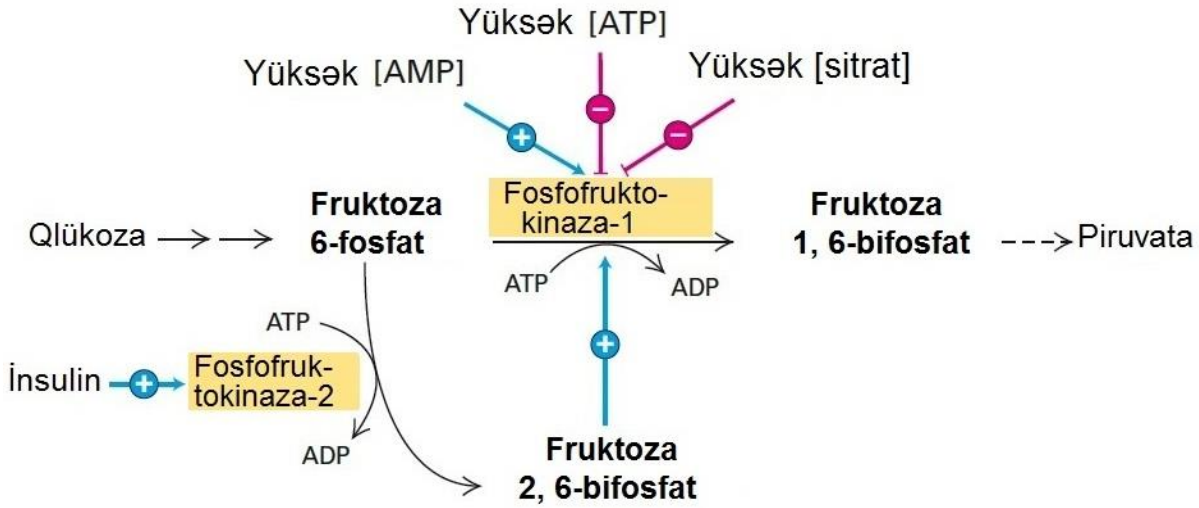
ATP-nin lazım olan səviyyəsini saxlamaq üçün hüceyrələr qlükoza metabolizminə nəzarət etməlidirlər. Qlikolitik yolun (I mərhələ), eləcə də limon turşusu tsiklinin (II mərhələ) fəaliyyəti fasiləsiz şəkildə tənzimlənir, ilk növbədə allosterik mexznizmlərlə (allosterik nəzarətin əsas prinsiplərinə görə bax Fəsil 3). Qlikolizə daxil olan üç allosterik ferment bütun qlikolitik yolun tənzimlənməsində əsas rolu oynayır. *Heksokinaza* (Şəkil 12-3, pillə 1) öz reaksiya məhsulu qlükoza-6-fosfatla ingibirləşir. *Piruvat kinaza* (pillə 10) ATP ilə ingibirləşir, beləliklə ATP-nin həddən artıq çox olması ilə qlikoliz zəifləyir. Üçüncü ferment *fosfofruktokinaza-1* (pillə 3) qlikolitik yolun əsas sürət-məhdudlaaşdıran fermentidir. Qlikolizin sürətinin tənzimlənməsində onun kritik roluna simvolik olaraq, bu molekul bir sıra molekullarla allosterik nəzarət olunur (Şəkil 12-14).

Məsələn, fosfofruktokinaza-1 ATP ilə allosterik *ingibirləşir* və adenozin monofosfatla (AMP) allosterik *fəallaşır*. Nəticədə, qlikolizin sürəti hüceyrənin **enerji yükünə**, ([ATP] + 0.5 [ADP]) / ([ATP] + [AMP])-ə bərabər olan "yüksək-enerjili" fosfoanhidrid əlaqəsinə malik olan ümumi adenozin fosfat fraksiyasının ölçüsünə çox həssas olur. Fosfofruktokinaza-1-in ATP ilə allosterik ingibirləşməsi qeyri-adi görünə bilər, çünki ATP həm də fermentin substratıdır. Amma, substrat-birləşən mərkəzin ATP-yə olan afinliyi

allosterik mərkəzin afinliyinə nisbətən çox yüksəkdir (aşağı K_m malikdir). Beləliklə, aşağı qatılıqlarda, ATP ingibirləşdirici allosterik mərkəzə deyil, katalitik mərkəzə birləşir və fermentativ kataliz maksimuma yaxın sürətlə davam edir. Yüksək qatılıqlarda, ATP allosterik mərkəzə də birləşir, fermentin başqa substratlara, fruktoza-6-fosfata olan afinliyini azaldan konformasiya dəyişikliyini induksiya edərək bu reaksiyanın gedişini və qlikolizin ümumi sürətini zəiflədir.



ŞƏKİL 12-3 Qlikolitik yol. On reaksiyadan ibarət olan reaksiyalar sırası qlükozanı piruvata parçalayır. İki reaksiya ATP sərf edərək ADP əmələ gətirir və şəkəri fosforlaşdırır (qırmızı), ikisi substrat-səviyyəsində fosforlaşma yolu ilə ADP-dən ATP-ni yaradır (yaşıl), biri isə NAD^+ reduksiya etməklə NADH yaradır (sarı). Qeyd edək ki, qlükoza ilə piruvat arasında bütün aralıq məhsullar fosforlaşmış birləşmələrdir. Bir oxla göstərilən reaksiya 1, 3 və 10 pillələr mahiyyətcə hüceyrədə adi şəraitdə geriyə dönməzdirlər (yüksək mənfi ΔG qiymətinə malikdirlər).



ŞƏKİL 12-4 Qlükoza metabolizminin allosterik tənzimlənməsi. Qlikolizdə əsas tənzimləyici ferment olan fosfofruktokinaza-1 hüceyrənin enerji ehtiyatı aşağı olanda səviyyəsi yüksələn AMP və fruktoza 2,6-difosfatla allosterik fəallaşır. Ferment ATP və sitratla ingibirləşir, hüceyrə qlükozanı fəal şəkildə CO_2-ə qədər oksidləşdirdikdə (enerji ehtiyatı yüksək olanda) bunların hər ikisinin səviyyəsi artır. Sonra biz görəcəyik ki, sitrat qlükoza oksidləşməsinin II mərhələsinin gedişində yaranır. Fosfofruktokinaza-2 ikifunksiyalı fermentdir: onun kinaza fəallığı fruktoza 6-fosfatdan fruktoza 2,6-difosfatı yaradır, fosfataza fəallığı isə əksinə reaksiyanı kataliz edir. Qanda qlükozanın səviyyəsi yüksək olduqda mədəaltı vəzi tərəfindən ifraz olunan insulin, fosfofruktokinaza-2 kinazanın fəallığını artırır və bununla da qlikolizi stimullaşdırır. Qanda qlükozanın səviyyəsi aşağı olduqda, qlükaqon mədəaltı vəz tərəfindən buraxılır və qaraciyərdə fosfofruktokinaza-2 fosfatazanın fəallığını artırır, beləliklə dolayı yolla qlikolizi zəiflədir.

Fosfofruktokinaza-1-in başqa bir allosterik aktivatoru *fruktoza 2,6-difosfatdır*. Bu metabolit *fosfofruktokinaza-2* fermenti vasitəsi ilə fruktoza 6-difosfatdan əmələ gəlir. Fruktoza 6-fosfat fruktoza 2,6-difosfatın əmələ gəlməsini sürətləndirir, o da öz növbəsində fosfofruktokinaza-1-i fəallaşdırır. Bu tipli nəzarət *qabaqlayıcı-fəallaşdırma* (*feed-forward activation*) kimi məlumdur, burada metabolitin (indiki halda fruktoza 6-fosfat) zəngin olması onun sonrakı metabolizmini sürətləndirir. Fruktoza 2,6-difosfat qara ciyər hüceyrələrində yüksək qatılıqlı ATP-nin ingibirləşdirici təsirini azaltmaqla və fosfofruktokinaza-1-in afinliyiuni onun substratlarından biri olan fruktoza 6-fosfata qaldırmaqla fosfofruktokinaza-1-i allosterik fəallaşdırır.

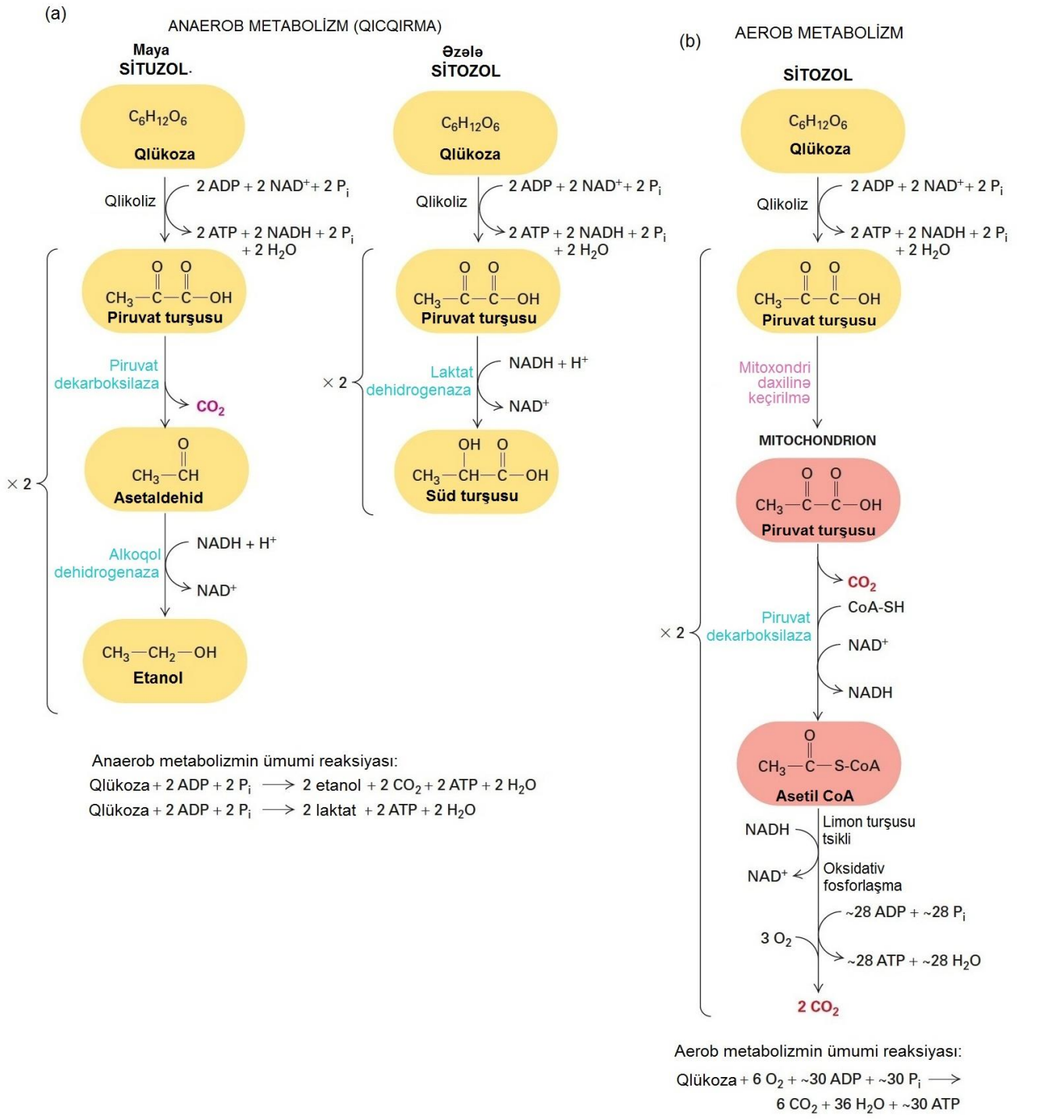
Allosteriya ilə tənzimlənən üç qlikolitik ferment, yüksək mənfi $\Delta G^{o\prime}$ qiyməti olan reaksiyaları, yəni adi şəraitlərdə əsasən geriyə dönməyən reaksiyaları kataliz edir. Ona görə də, bu fermentlər bütün qlikolitik yolun tənzimlənməsi üçün əlverişlidir. Əlavə nəzarət, NAD^+-ın NADH-a qədər reduksiyasını kataliz edən qliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaza tərəfindən həyata keçirilir (bax Şəkil 12-3, pillə 6). Biz görəcəyik ki, NADH, sonra mitoxondridə oksidadtiv fosforlaşma zamanı istifadə olunan yüksək-enerjili elektron daşıyıcısıdır. Əgər sitozolda olan NADH mitoxondrial oksidləşmənin zəifləməsi hesabına yaranırsa, pillə 6 termodinamik cəhətdən az əlverişli olur.

Bütövlükdə orqanizmin metabolik tələbatını ödəmək üçün məməlilərin müxtəlif toxumalarında, qlükozanın metabolizmi fərqli yollarla tənzimlənir. Məsələn, karbohidrat aclığı zamanı, qaraciyərin qlükozanı qan dövranına buraxması lazım gəlir. Qara ciyər bunu emək üçün qlükozanın polimer şəkilində olan ehtiyat forması qlikogeni (bax Fəsil 2) birbaşa qlükoza 6-fosfata çevirir (heksokinazanın iştirakı olmadan pillə 1). Bu şəraitdə, fruktoza 2,6-difosfatın səviyyəsinin reduksiyası baş verir və fosfofruktokinaza-1 fəallığı azalır (bax Şəkil 12-4). Nəticədə, qlikogendən ayrılan qlükoza 6-fosfat piruvata qədər metabolizmə uğrayır, əksinə, o fosfataza ilə qlükozaya çevrilir və özünün enerji tələbatı üçün əsasən qlükozadan asılı olan beyni və qırmızı qan hüceyrələrini qidalandırmaq üçün qana buraxılır. Bütün hallarda, bu tənzimlənən fermentlərin fəallığı kiçik molekullu metabolitlərin səviyyəsi ilə, ümumən allosterik qarşılıqlı əlaqələrlə və ya hormon-vasitəsi ilə fosforlaşma və defosforlaşma reaksiyaları ilə tənzimlənir. (Qaraciyərdə və əzələlərdə qlükoza metabolizminin hormonal nəzarət olunmasının ətraflı müzakirəsi Fəsil 15-də verilmişdir.)

Oksigen Çatmayanda Qlükoza Qıcqırır

İnsan da daxil olmaqla əksər eukaryotlar *obliqativ aeroblar*dır: onlar yalnız molekulyar oksigen olan halda inkişaf edirlər və qlükozanı (və ya oxşar şəkərləri) böyük miqdarda ATP istehsalının müşayəti ilə tam CO_2 qədər metabolizm edirlər. Amma, əksər eukaryotlar ATP-ni anaerob metabolizmlə də yarada bilirlər. Çox az eukaryotlar *fakultativ anaeroblardır*: onlar istər oksigen mövcud olan halda, istərsə olmayan halda inkişaf edirlər. Məsələn, annelidlər (seqmentli qurdlar), molyusklar və bəzi mayalar qıcqırma yolu ilə əmələ gələn ATP hesabına oksigensiz də yaşaya bilirlər.

Oksigen olmayan halda, maya qlikoliz nəticəsində yaranan piruvatın hər birini bir molekul etanola və CO_2 çevirir, bu reaksiyalarda, iki NADH molekulu, qlikolizin davam etməsi üçün lazım olan NAD^+-a oksidləşir (Şəkil 12-5a, *solda*). Qlükozanın **qıcqırma** adlanan bu anaerob katobalizmi, pivə və şərab istehsalının əsasını təşkil edir.



ŞƏKİL 12-5 Qlükozanın aerob metabolizminə qarşı anaerob metabolizmi. Qlikoliz zamanı yaranan piruvatın son müqəddəratı oksigenin mövcud olub-olmamasından asılıdır. (a) Oksigen mövcud olmadıqda, piruvat yalnız qismən parçalanır və sonra ATP istehsal olunmur. Amma, qlikoliz zamanı yaranan hər bir NADH molekulundan iki elktron, qlikolizin fasiləsiz davam etməsi üçün tələb olunan NAD^+-ın regenerasiya edilməsi üçün akseptor molekula keçirilir. Mayada (*solda*) asetaldehid elektron akseptorudur, etanol isə məhsuldur. Bu proses *spirt qıcqırması* adlanır. Əzələ hüceyrələrində oksigen çatışmayanda (*sağda*), NADH süd turşusunu əmələ gətirmək üçün piruvatı reduksiya edərək NAD^+-a regenerasiya olunur, bu proses *süd turşusu qıcqırması* adlanır. (b) Oksigen mövcud olanda, piruvat mitoxondriyə daşınır, burada o, əvvəlcə piruvatdehidrogenaza vasitəsilə bir molekul CO_2 və bir molekul asetat (sirkə) turşusuna çevrilir, sonuncu isə koenzim A (CoA-SH) ilə birləşir, bir molekul NAD^+-ın NADH-a reduksiyası ilə yanaşı asetil CoA yaranır. Asetil CoA-nın və NADH-ın sonrakı metabolizmi hər oksidləşən qlükoza molekuluna görə təxminən 28 əlavə ATP molekulunu yaradır.

Qıcqırma heyvan hüceyrələrində də baş verir, amma spirt əvəzinə süd turşusu yaranır. Məməlilərin skelet əzələ hüceyrələrinin uzunsürən dartılmaları zamanı – məsələn idman məşqləri zamanı – əzələ toxuması daxilində oksigen qıtlığı yarana bilir. Bunun nəticəsində, qlükozanın katabolizmi qlikolizlə məhdudlaşır və əzələ hüceyrələri eyni zamanda iki NADH-ın iki NAD^+-a oksidləşməsini aparan reduksiya reaksiyası vasitəsilə iki piruvatı iki süd turşusu molekuluna çevirir (Şəkil 12-5a, *sağda*). Baxmayaraq ki, süd turşusu əsasən əzələlərdən qana buraxılır, amma, əzələ dartılması kifayət qədər kəskin və sürətli olarsa süd turşusu müvəqqəti olaraq toxumalarda toplanır və məşqlər zamanı əzələlərdə və oynaqlarda ağrılara səbəb olur. Qana ifraz olunduqdan sonra, süd turşusunun müəyyən hissəsi qara ciyərə keçir, orada yenidən piruvata oksidləşir və daha sonra ya aerob yolla CO_2 qədər parçalanır ya da geriyə, qlükozaya çevrilir. Süd türşusunun çox hissəsi ürək vasitəsilə CO_2-a qədər parçalanır, bu da qana sorulur, məşqlər zamanı aerob metabolizm davam edə bilir, oksigenlə kasıb olan skelet əzələləri də süd turşusu ifraz edirlər. Əgər qanda çox miqdarda süd turşusu toplanırsa, turşu qanın pH-nın qeyri sağlam dərəcədə aşağı enməsinə (laktik asidoza) səbəb olur. Süd turşusu bakteriyası (südü çürüdən orqanizm) və digər prokariotlar da həmçinin qlükozanın süd turşusuna qədər qıcqırması ilə ATP əmələ gətirirlər.

Qıcqırma ATP-ni yaratmaq üçün aerob oksidləşməyə nisbətən daha az səmərəli yoldur, ona görə də heyvan hüceyrələrində yalnız oksigen qıtlığı zamanı baş verir. Oksigen mövcud olan halda, qlikolizlə yaranan piruvat mitoxondriyə daşınır, orada O_2 ilə Şəkil 12-5b-də verilmiş bir sıra reaksiyalar vasitəsilə CO_2 və H_2O-a qədər oksidləşir. Şəkil 12-1-də təsvir edilmiş prosesin II-IV mərhələlərində baş verən qlükozanın bu aerob metabolizmi anaerob qlükoza metabolizminin (qıcqırma) ATP istehsalını çox-çox ötərək başlanğıcda istifadə edilən hər qlükoza molekulundan 28 əlavə ATP molekullarını yaradır.

Aerob oksidləşmə ilə ATP-nin səmərəli şəkildə necə yarandığını anlamaq üçün biz əvvəlcə bu prosesin baş verdiyi orqanoidin, mitoxondrinin quruluşuna baxmalıyıq. Mitoxondri və onun daxilində baş verən reaksiyalar növbəti bölmənin mövzusudur.

12.1 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Qlükozadan Enerjini Toplamağın Birinci Mərhələsi: Qlikoliz

- Aerob oksidləşmə kimi məlum olan prosesdə hüceyrələr qlükozanın və ya yağ turşusunun oksidləşməsindən ayrılan enerjini ATP-nin terminal fosfoanhidrid rabitəsinə çevirirlər.
- Hər bir qlükoza molekulunun tam aerob oksidləşməsi altı molekul CO_2 və təxminən 30 ATP molekulunu istehsal edir. Sitozolda başlayan və mitoxondridə tamamlanan tam proses dörd mərhələyə bölünə bilər: (I) sitozolda qlükozanın iki molekul piruvata parçalanması (qlikoliz); (II) mitoxondridə piruvatın yüksək-enerjili elektron daşıyıcıları NADH və $FADH_2$ əmələ gəlməsi ilə nəticələnən CO_2-ə oksidləşməsi (limon turşusu tsikli yolu ilə); (III) molekulyar oksigeni suya çevirməklə birlikdə proton-hərəkverici qüvvəni yaradan elektron nəqliyyatı; və (IV) ATP sintezi (bax Şəkil 12-1). Hər bir qlükoza molekulundan qlikoliz zamanı (I mərhələdə) iki ATP və II-IV mərhələlərdə təxminən 28 ATP yaranır.
- Qlikolizdə (mərhələ I), sitozol fermentləri qlükozanı iki molekul piruvata çevirir və NADH və ATP-nin hər birindən iki molekul yaradır (bax Şəkil 12-3).
- Qlükozanın qlikoliz ilə oksidləşməsinin sürəti, hüceyrənin ATP-yə olan tələbatından asılı olaraq bir sıra fermentlərin stimullaşması və ya ingibirləşməsi ilə tənzimlənir (bax Şəkil 12-4). ATP çox olanda qlükoza ehtiyat şəkilində, məsələn qlikogen kimi saxlanılır.
- Oksigen olmayanda (anaerob şəraitdə), hüceyrələr piruvatı süd turşusuna və ya (maya olan halda) etanola və CO_2 qədər metabilzm edə bilirlər, proses zamanı NADH geriyə, fasiləsiz qlikoliz üçün lazım olan NAD^+ çevrilir. Oksigen mövcud olan halda (aerob şəraitdə), piuvat mitoxondriyə daşınır və orada CO_2 qədər parçalanır, proses zamanı külli miqdarda ATP yaranır (bax Şəkil 12-5).

12.2 Mitoxondrinin quruluşu və fəaliyyəti

Oksigen-istehsal edən fotosintetik sianobakteriya təxminən 2.7 milliard il öncə yaranmışdır. Sonradan yerin atmosferində kifayət qədər oksigenin (O_2) yaranması növbəti 1 milliard il ərzində orqanizmlər üçün çox səmərəli aerob oksidləşmə yolunu yaratmaq üçün bir imkan açdı və öz növbəsində təkamülə, xüsusən Kambri partlayışı dövründə böyük və mürəkkəb bədən formalarının və onlarla bağlı olan metabolik fəallığın yaranmasına imkan verdi. Eukaryot hüceyrələrdə aerob oksidləşmə mitoxondrilərdə aparılır (mərhələ II-IV). Əslində, mitoxondrilər bol oksigenin üstünlüklərindən tam istifadə edərək ATP yaradan fabriklərdir. Biz əvvəlcə onların quruluşunu, dinamikasını və müxtəlif funksiyalarını təsvir edirik, sonra isə piruvatı parçalayaraq ATP yaratmaq üçün istifadə etdiyi reaksiyaları təsvir edirik.

Mitoxondrilər Çoxfunksiyalı Orqanoidlərdir

Mitoxondrilər (Şəkil 12-6) eukaryot hüceyrənin böyük orqanoidləri sırasındadır. Mitoxondri təxminən *E. coli* bakteriyası ölçüsündədir, bu təccübləndirici deyildir, çünki bizim aşağıda görəcəyimiz kimi, guman olunur ki, bakterialar mitixondrilərin təkamülcə əcdadıdır. Eukaryot hüceyrələrin əksəriyyəti çoxsaylı mitoxondrilərə malikdirlər ki, bunlar da ümumilikdə sitoplazmanın həcminin 25 faizə qədərini tuturlar. Hüceyrələrdə mitoxondrilərin sayı—məməlilərin hüceyrələrində yüzdən minə qədər—onların ATP-yə olan tələbatını təmin etmək üçün tənzimlənir (məsələn, xüsusiləşmiş mədə hüceyrələri turşu ifrazında külli miqdarda ATP istifadə etmək üçün çox sayda mitoxondriyə malikdirlər).

Hərçənd ki, bu fəsildə bizim diqqətimiz mitoxondrinin ATP əmələ gətirmək mexanizmləri üzərində cəmlənmişdir, amma yadda saxlamaq vacibdir ki, mitoxondri geniş müxtəliflikdə kritik hüceyrə proseslərində iştirak edir (Cədvəl 12-1). Mitoxondrilər çoxsaylı kiçik molekulların sintezimdə iştirak edirlər. Bir sıra hallarda, bu biosintez yolundakı bəzi mərhələlər mitoxondrinin daxilində, bəziləri isə xaricində baş verir (mitoxondrixarici mərhələlər), bəzi sələflərin və məhsulların nəqliyyat zülalları vasitəsilə mitoxondri daxilinə və

ya xaricinə daşınmasını tələb edirlər. Məsələn, çox eukaryotlarda mitoxondri hem biosintezinin birinci dərəcəli sürət-məhdudlaşdırıcısıdır. Bu birinci mərhələnin məhsulu sonra əlavə modifikasiyalar üçün sitoplazmaya eksport olunur, burada yeni sələf məhsul istehsal olunur və son mərhələlərin gedişi üçün yenidən mitoxondriyə daşınır. Sitoplazmada geniş müxtəliflikdə kiçik molekulların biosintezi mitoxondridən asılıdır. Mitoxondri sitoplazmaya kiçik üzvi molekulları, məsələn NADPH (enerji mənbəi kimi), asetil CoA-nı (karbon mənbəi kimi) istehsal etmək üçün istifadə oluna bilən sitratı, izositratı, malatı, fumaratı və α-ketoqlutaratı və ya mitoxondrixarici biosintezlər üçün qulitation, purinlər, yağ turşuları xolesterin kimi başqa sələfləri təmin edir.

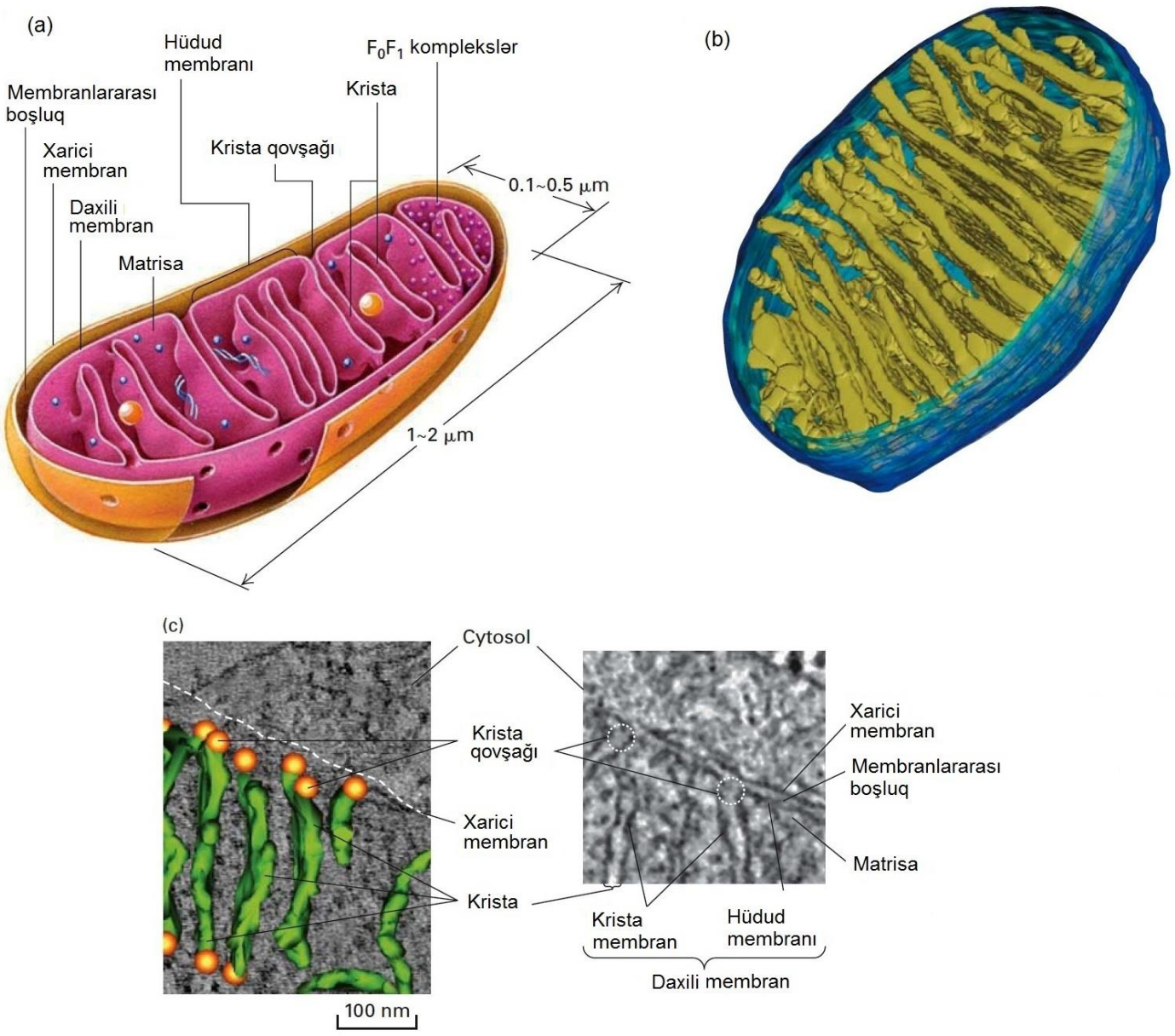
Mitoxondrinin Quruluşuna və Funksiyasına Görə İki Fərqli Membaranı Var

Mitoxondrinin quruluşunun detalları (bax Şəkil 12-6) elektron mikroskopunda müşahidə oluna bilər (bax Şəkil 1-20). Hər bir mitoxondridə iki fərqli konsentrik membran vardır: daxili və xarici mitoxondri membranları. Xarici mitoxondrial membran mitoxondrinin xarici hamar perimetrini müəyyən edir. Daxili membran birbaşa xarici membranın altında yerləşir. Daxili mitoxondri membranı özlüyündə fasiləsiz davam edən tək membran olub tərkibinə və quruluşuna görə fərqli üç domendən ibarətdir. *Hüdud membranı* yastı daxili mitoxondrial membrandır, birbaşa xarici membranın daxilinə yaxın bitişik yerləşmişdir. *Kristalar* hüdud membranın perimetirindən mitoxondrinin mərkəzinə doğru uzanan çoxsaylı qırışlara (invaqinasiyalara) malikdir. Daxili hüdud membranları ilə cristalar arasındakı əlaqələr *krista qovşaqları* adlanır (Şəkil 12-6a və c).

Kristaların uzunluğu və onların quruluşu (formasına görə boruşəkilli, blinçikşəkilli ola bilir) mitoxondri daxilində müxtəlif ola bilir. Krista qovşaqları, onların kənarları və ucları yüksək dərəcədə burulmuşdur. Krista qovşaqlarının əyriliyi (bax Şəkil 12-6c) MICOS (mitoxondrial kontakt saytı və krista təşkili sistemi) adlanan zülal kompleksindən asılıdır, bu kompleks homo-oliqomerləşən və daxili membrana əyilərək yüksək burulmanı əmələ gətirən inteqral membran subvahidinə malikdir. MICOS həmçinin xarici membran-assosasiyalı zülala birləşməklə xarici membranla daxili membranın sıx yaxınlığını həyata keçirir. Bundan başqa, MICOS həmçinin diffuziya baryeri rolunu oynayaraq hüdud membranında və krista membranında müxtəlif zülalların və lipidlərin qarışmasına mane olur. Biz kristanın uclarında və kənarlarında burulmanın molekulyar əsaslarını Bölmə 12.5-də müzakirə edəcəyik.

Cədvəl 12-1 Mitoxondrinin çoxsaylı funksiyaları

Kiçik molekulların biosintezi və ya prosessinqi
Yağ turşuları
Steroid hormonlar
Pirimidinlər
Dəmir-sulfat klasterləri
Hem
Fosfolipidlər (fosfatidiletanolamin, fosfatidilqliserol, kardiolipin)
Ubixinon
Amin turşuları (sintezi, bir-birinə çevrilmələri və katobalizmi)
Digər mitoxondri funksiyaları
Oksidativ fosforlaşma və ATP sintezi
Reaktiv oksigen nümunələrinin (ROS) homeostazı
İon homeostazı (məsələn kalsium)
Ammonium detoksifikasiyası
Yağ turşularının oksidləşməsi
Qonur piydə termogenez (istiliyin yaranması)
Anadangəlmə immunitetə və iltihaba kömək
Tənzimlənən hüceyrə ölümü yolları (məsələn, apoptoz)
Mitoxondri ilə assosasiyada olan membranlarla (MAM) təsir olunan hüceyrə prosesləri
Mitoxondrinin forma və dinamikası
PINK1/Parkin-dən-asılı olan mitofaqiya ((MAM-larda inisiasiya olunur)
Kalsiumun mitoxondri daxilinə daşınması
Kalsium homeostazı və kalsiumla-ötürülən siqnal sistemi
Qlükoza və enerji metabolizmi
Fosfatidilserin və yəqin ki, xolesterin daxil olmaqla ER-dan lipidlərin mitoxondrial importu
Fosfatidiletanolamin və steroid hormonlar daxil olmaqla lipidlərin mitoxondridə biosintezi
Stresə cavab
Hüceyrələrin tənzimlənən hüceyrə ölümü ilə sağ qalması (bax Fəsil 21)
İnflamasomr və anadangəlmə immun cavabı yolu ilə iltihaba cavabı (bax Fəsil 23)
Virus yoluxmalarının daxil olduğu yollar (sitomeqalovirus, hepatit C virusu)
Neyrodegenerativ patologiya (Alzheymer və Parkinson xəstəlikləri)

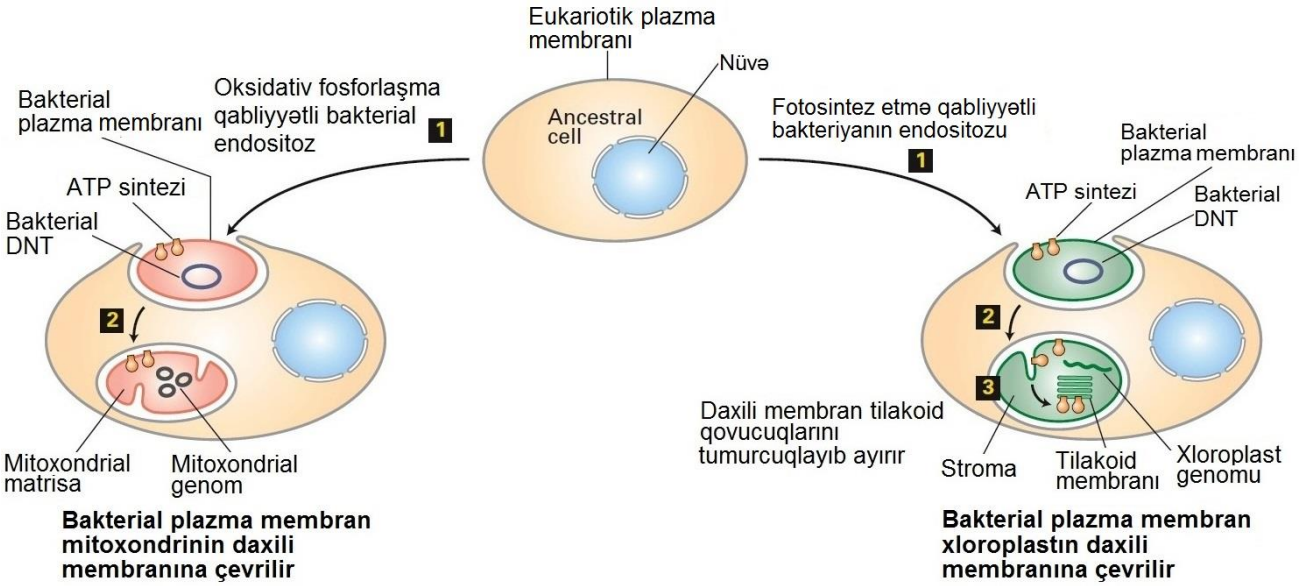


ŞƏKİL 12-6 Mitoxondrinin daxili quruluşu. (a) Sxematik diaqram əsas membranları və kompartmentləri göstərir. Hamar xarici membran mitoxondrinin xarici sərhədlərini təşkil edir. Daxili membran tək fasiləsiz davam edən mebran olub üç fərqli domendən ibarətdir: hüdud membranı, krista və krista qovşaqları. Hüdud membranı yastı olub birbaşa xarici membranın altında ona bitişikdir. Krista vərəq-şəkilli və borucuqşəkilli invaqinasiyalar olub hüdud membranından mitoxondrinin mərkəzinə doğru uzanır. Kəskin əyilmələr hüdud membranları ilə krista arasında əlaqə əmələ gətirir, bunlara *krista qovşaqları* deyilir. Membranlararası boşluq hər bir kristanın lümeni ilə davam edir. ATP sintez edən F_0F_1 komplekslər (kiçik qırmzı kürələr) transmembran zərrəciklər olub krista və daxili membrandan matrisaya tərəf çıxır. Matrisa mitoxondrial DNT-lərə (mavi zəncirlər), ribosomlara (kiçik mavi kürələr) və qranulalara (böyük sarı kürələr) malikdir. (b) Toyuq beyni mitoxondrisinin bir hissəsinin kompüterlə yaradılan modeli. Bu model, müntəzəm intervalda yazılmış iki-ölçülü elektron mikroskopu müşahidələri sırasından hesablanan üç-ölçülü elektron mikroskopu təsvirinə əsaslanır. Bu metod tibbi vizuallaşdırmada istifadə olunan üç-ölçülü rentgen tomoqrammasına və ya CAT skaninq tamoqrafiyasına analojidir. Sıx şəkildə bükülmüş kristaya (yaşıl-sarı), daxili membrana (açıq mavi) və xarici membrana (tünd göy) diqqət edək. (c) İnsan fibroblastlarının krista və krista qovşaqları elektron mikroskopundan və tomoqrafiyadan istifadə edərək vizuallaşdırılmış və modelləşdirilmişdir. Sıx panel mitoxondridən keçən, transmisiyalı elektron mikroskopu ilə təsviri alınmış çoxsaylı kəsiklərdən birini göstərir, mitoxondri membranı açıq şəkildə fərqlənir. Daxili membranda qovşaqlarda (nöqtəli dairələr) krista membranlarını daxili hüdud membranından ayıran kəskin əyilmələr açıq şəkildə görünür. Sol panel EM təsvirində bir-birinin üzərində durmuş laminar kristanın görünən kənarlarının (yaşıl) və krista qovşaqlarının (narıncı kürələr) üç-ölçülü tomoqrafik modelini göstərir. [(b) hissəsi T. G. Frey and G. A. Perkins. (c) hissəsi *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 2013. 110 (22): 8936-8941, Fig. 6. Fig. 6A and C, "STED super-resolution microscopy reveals an array of MINOS clusters along human mitochondria," by Jans et al.]

Xarici və daxili membranlar topoloji olaraq iki submitoxondri kompartmentini müəyyən edir: daxili və xarici membranlar arasında *membranlararası sahə* və daxili membran üzərində lümenləri əmələ gətirən *matrisa* və ya mərkəzi kompartment (bax Şəkil 12-6a). Qida maddələrində saxlanılan enerjinin ATP-də saxlanılan enerjiyə ötürülməsində birbaşa iştirak edən çox zülallar, məsələn, elektron-nəqliyyat zəncirinin və ATP sintezinin zülalları daxili mitoxondrial membranda yerləşirlər. İnvaqinasiya edən kristalar daxili mitoxondrial membranın səthinin sahəsini güclü surətdə genişləndirir, bununla da mitoxondrinin ATP sintez etmə qabliyyətini artırır. Məsələn, tipik qaraciyər mitoxondrisində daxili membranın sahəsi kristalar da daxil olmaqla xarici membranın sahəsindən təxminən beş dəfə artıqdır. Faktiki olaraq, qaraciyər hüceyrələrində daxili mitoxondrial membranın ümumi sahəsi plazma membranın sahəsindən 17 dəfə böyükdür. Ürək və skelet əzələlərində mitoxondri qaraciyər mitoxondrilərində olanlardan üç dəfə çox kristaya malikdirlər – yəqin ki, bu əzələ hüceyrələrinin ATP-yə daha çox tələbatı olduğunu əks etdirir.

Mitoxondri membranlarının və kompartmentlərinin fraksiyalara ayrılması və təmizlənməsi onların zülal, DNT və fosfolipid tərkibini təyin etməyə və hər bir fermentlə kataliz olunan reaksiyanın spesifik membranda və ya kompartmentdə lokalizasiyasının təyininə imkan verdi. Mitoxondrinin əmələ gəlməsinə və onun tam fəaliyyətinə imkan vermək üçün mindən artıq müxtəlif tipli polipeptid və zülallar tələb olunur. Aparılmış ətraflı biokimyəvi analizlər məməlilərin mitoxondrisində ən azı 1098 zülalı aşkar etdi, və ehtimal olunur ki, bunlar 1500-ə qədərdir. Mitoxondri ilə assosasiyada olan bu zülalların qüsurlu funksiyası, məsələn irsi ötürülən genetik mutasiyalar kimi, insanın 250-dən artıq xəstəliyinin yaranmasına səbəb olur. Bunlardan ən çox rast gəlinəni elektron-nəqliyyat zənciri ilə bağlı olan xəstəliklərdir, bunlar da 150 gendən istənilən birindəki mutasiya nəticəsində yaranır və müxtəlif fizioloji sistemlər daxilində əzələlərə, ürəyə, sinir sisteminə və qara ciyərə təsir edən geniş müxtəliflikdə kliniki anormallığı nümayiş etdirir. Mitoxondri ilə bağlı olan başqa xəstəliklərə, çoxsaylı düzgün anatomik formalaşma və birləşdirici toxuma qüsurları olan Müller sindromu daxildir.

Xarici membranlarda ən zəngin zülal, quruluşuna görə bakterial porinlərə (bax Şəkil 7-18) oxşar olan transmembran kanal zülalı, VDAC (gərginlikdən asılı olan anion kanalı – ***v***oltage-***d***ependent ***a***nion ***c***hannel) adlanan mitoxondrial β-çəllək **porindir.** Bu kanal zülalları açıq olanda ionlar və əksər kiçik hidrofil molekullar (təxminən 5000 Da qədər) asanlıqla onlardan keçə bilirlər. Baxmayaraq ki, ola bisin mitoxondrial porinlərin açılmasının və oradan metabolitlərin xarici membranı keçməsinin metabolik tənzimlənməsi mövcuddur, lakin daxili membran və onun kristaları, mitoxondrial oksidləşmənin və ATP yaranmasının sürətini məhdudlaşdırmaqla mitoxondrial matrisa ilə sitozol arasında əsas keçiricilik baryeridir.



ŞƏKİL 12-7 Mitoxondri və xloroplastın təkamül mənşəinin endosimbiont nəzəriyyəsi. Əcdad eukaryot hüceyrələrlə bakteriyaların endositozu (pillə 1) iki membranlı orqanoidləri yaradır, xarici membran eukaryot hüceyrənin plazma membranından törəmiş, daxili membran isə bakterial membrandan törəmişdir (pillə 2). Əcdad bakterial membranda yerləşmiş zülallar öz istiqamətlətini (orientasiyasını) elə saxlamışlar ki, zülalın xaricə baxan hissəsi indi membranlararası boşluğa baxır. Məsələn, bakterial membranın sitozol üzündə yerləşmiş ATP sintazanın F_1 subvahidi, yaranmış mitoxondrinin (*solda*) və xloroplastın (*sağda*) membranında matrisaya baxır. Müasir bitkilərdə xloroplastların inkişafı zamanı daxili xloroplast membranından qovucuqların tumurcuqlaması sitozol üzündə qalan F_1 subvahidlə, xloroplast stromasına baxan tilakoid membranlarını yaratmışdır (pillə 3). Orqanoid DNT-ləri göstərilir. Gölgələnmiş sahəyə baxan membran səthi sitozol üzüdür, kölgəsiz sahəyə baxan səth isə eqzoplazmatik üzdür.

Zülallar daxili mitoxondrial membranın ümumi kütləsinin 76 faizini təşkil edir – bu faiz bütün başqa hüceyrə membranlarının hamısından yüksəkdir. Bu zülalların çoxu oksidativ fosforlaşmanın əsas iştirakçılarıdır. Bunlara, ATP-

sintaza, elektron nəqliyyatını həyata keçirən zülallar və metabolitlərin sitozol ilə mitoxondri matrisası arasında daşınmasını həyata keçirən geniş müxtəlifliyə malik olan nəqliyyat zülalları daxildirlər. İnsan genomu bir mitoxondrial nəqliyyat zülalı ailəsinin 48 nümayəndəsini kodlaşdırır. Bunlardan biri ADP/ATP daşıyıcı adlanır, sitozolda yaranan ADP ilə mübadilədə yeni sintez olunmuş ATP-ni matrisadan kənara, daxili membran boşluğuna (və sonra da sitozola) daşıyan antiporterdir. Bu əhəmiyyətli antiporter olmadan mitoxondrial ATP-nin kimyəvi rabitələrində tutulub saxlanılmış enerji hüceyrənin qalan hissələri üçün əlçatmaz olardı.

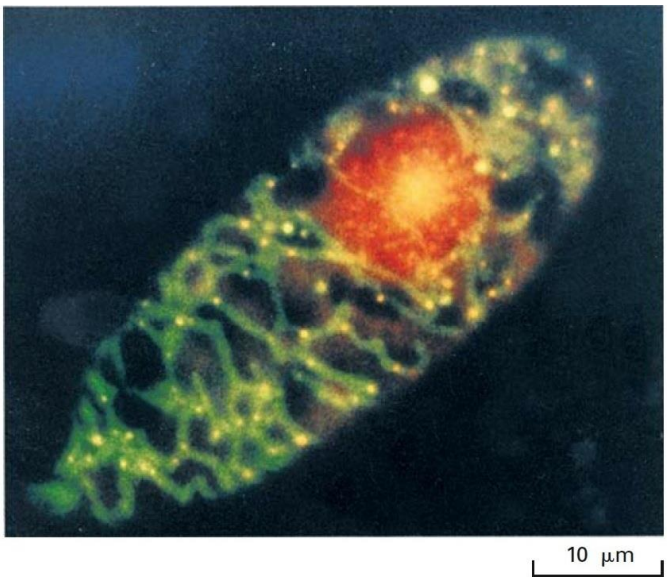
Qeyd edək ki, heyvanlar kimi bitkilər də mitoxondriyə malikdirlər və aerob oksidləşməni həyata keçirirlər. Bitkilərdə ehtiyat saxlanılan karbohidratlar, əsasən də nişasta şəkilində saxlanılan karbohidratlar, qlükozaya hidroliz olunurlar. Sonra qlikoliz piruvatı istehsal edir, o da heyvan hüceyrələrində olduğu kimi mitoxondriyə daşınır. Piruvatın mitoxondrial oksidləşməsi və bununla yanaşı baş verən ATP sintezi fotosintetik hüceyrələrdə qaranlıq dövründə, fotosintez prosesi mümkün olmadıqda, köklərdə və başqa fotosintez etməyən toxumalarda isə həmişə baş verir.

Daxili mitoxondrial membran və matrisa, piruvatın və yağ turşularının CO_2 və H_2O qədər oksidləşməsinin və onunla bağlı olan ADP və P_i-dan ATP sintezinin daxil olduğu reaksiyaların əksəriyyətinin getdiyi mərkəzləridir. Hər bir reaksiya mitoxondridə ayrı-ayrı (diskret) membranlarda və ya mitoxondri boşluğunda baş verir (bax aşağıda Şəkil 12-16).

Mitoxondri Matrisada Yerləşmiş DNT-yə Malikdir

Hərçənd ki, eukaryotların çoxunda DNT-nin böyük əksəriyyəti hüceyrə nüvəsində tapılmışdır, amma müəyyən miqdarda DNT heyvanların, bitkilərin, göbələklərin mitoxondriləri və bitkilərin xloroplastları daxilində mövcuddur. Bir sıra sübutlar göstərir ki, mitoxondri və xloroplast eukaryotik nüvəyə malik olan əcdad hüceyrə tərəfindən udulmuş endosimbiontları əmələ gətirmiş eubakteriyalardan törənmişlər (Şəkil 12-7). Takamülün gedişi zamanı bakterial genlərin çoxu orqanoid DNT-sindən itirilmişdir. Nukleotidlərin, lipidlərin və amin turşularının biosintezində iştirak edən zülalları kodlaşdıran genlər kimi bəziləri ona görə itirilmişdir ki, onların funksiyası sahib hüceyrənin nüvə genomundakı genlər tərəfindən təmin olunur. Bu gün orqanoidlərin bəzi komponentlərini kodlaşdıran başqa genlər nüvəyə keçirilmişdir. Amma, bugünkü eukaryotların mitoxondriləri və xloroplastları orqanoidin funksiyası üçün vacib olan zülalları kodlaşdıran və eləcə də bu zülalların sintezi üçün tələb olunan ribosomal və nəqliyyat RNT-lərini kodlaşdıran DNT-ni öz daxilində saxlamışdır. Beləliklə, eukaryotik hüceyrələr çoxsaylı genetik sistemlərə malikdirlər: dominantlıq təşkil edən nüvə sistemi və mitoxondri ilə xloroplastlarda öz DNT-sinə, ribosomuna və tRNT-nə malik olan ikinci dərəcəli sistem.

Mitoxondrial DNT (mtDNT) mitoxondri matrisasında yerləşir (bax Şəkil 12-6). mtDNT-nin sarı fluoressent "nöqtələrinin" sayına görə göstərilən, sadə birhüceyrəli eukaryot *Euglena gracilis* hüceyrəsi ən azı 30 mtDNT molekuluna malikdir (Şəkil 12-8). mtDNT-nin replikasiyası və mitoxondrinin bölünməsi canlı hüceyrədə zaman-fasilə (time-lapse) mikroskopiya ilə izlənilə bilər. Bu cürə tədqiqatlar göstərir ki, orqanizmlərin çoxunda mtDNT interfaza dövründə replikasiya edir. Mitoz zamanı hər bir qız hüceyrə təxminən eyni sayda mitoxondri alır, amma mitoxondrinin qız hüceyrələri arasında dəqiq sayda paylaşdırılması mexanizmi olmadığından bəzi hüceyrələr başqalarından daha artıq mitoxondriyə malik olur. Beləliklə, mtDNT-nin ümumi miqdarı hüceyrədəki mitoxondrinin sayından, mtDNT-nin ölçüsündən və hər bir mitoxondri daxilindəki mtDNT-nin sayından asılıdır. Bu parametrlərin hər biri hüceyrə tipləri arasında güclü dəyişilir. Tipik insan hüceyrəsində hər nüvəyə görə 1000-2000 mtDNT molekulu olur, amma insanın yumurta hüceyrəsi 5000000 qədər, sperması isə 100 qədər mtDNTyə malik ola bilir.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 12-8 İkiqat rənglənmə *Euglena gracillis* hüceyrələrində çoxsaylı mitoxondrial DNT molekulunu aşkar edir. Hüceyrələr iki rəngin qatışığı ilə: DNT-yə birləşib qırmızı fluoressensiya buraxan etidium bromid və spesifik olaraq mitoxondri daxilinə birləşən və yaşıl fluoressensiya buraxan DiOC6 ilə işlənilir. Beləliklə nüvə qırmızı fluoressensiya buraxır, mitoxondrial DNT ilə zəngin olan rayon isə yaşıl ilə qırmızının kombinasiyası olan sarı fluoressensiya buraxır. [The Journal of Cell Science razılığı ilə Hayashi, Y. and Ueda, K., "The shape of mitochondria and the number of mitochondrial nucleoids during the cell cycle of *Euglena gracilis," Journal of Cell Science*, 1989, 93, pp 565-570-dən yenidən buraxılır.]

Mayada və digər birhüceyrəli orqanizmlərdə mutantların tədqiqi göstərdi ki, mitoxondridə sitoplazmatik irsiyyət də vardır (Şəkil 12-9). Məsələn, petit mutasiyalı maya hüceyrələri quruluşuna görə anormal mitoxondrini nümayiş etdirir və oksidativ fosforlaşma qabliyyətinə malik deyildir. Nəticədə, petit hüceyrələr təbii forma hüceyrələrlə müqayisədə zəif inkişaf edir və kiçik koloniyalar əmələ gətirir. Fərqli (haploid) maya ştammları arasında genetik çarpazlaşma göstərdi ki, *petit* mutasiya istənilən heç bir məlum nüvə genomu və ya xromosomu ilə seqreqasiya etmir. Sonrakı tədqiqatlarda aşkar edildi ki, əksər petit mutantlar mtDNT-də silinmələrə malikdir.

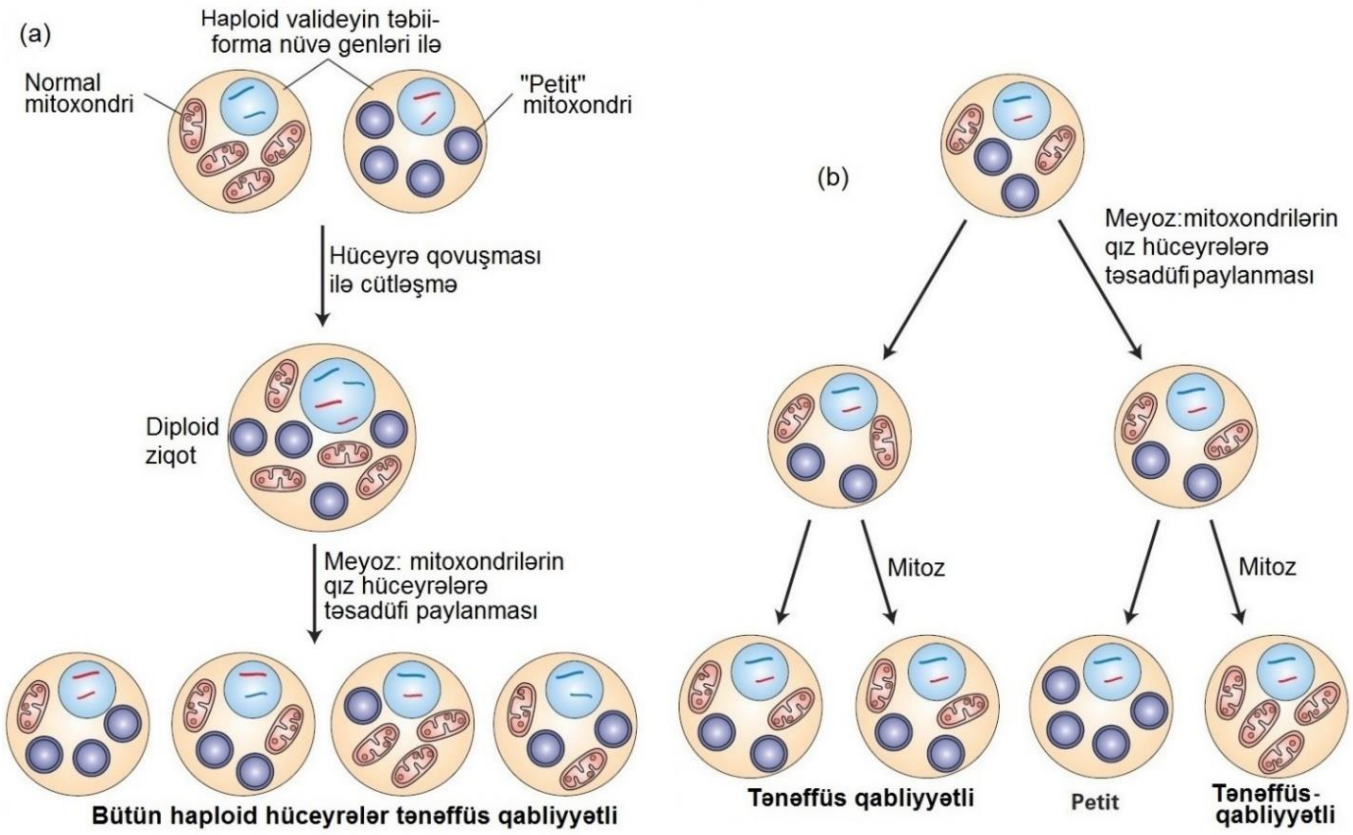
Haploid maya hüceyrələrinin qovuşma yolu ilə cütləşməsi zamanı hər iki valideyin əmələ gələn diploiddə sitoplazmaya

bərabər miqdarda öz töhfələrini verir, beləliklə, mitoxondrinin irsi ötürülməsi ikivalideyinlidir (bax Şəkil 12-9a). Amma, məməlilərdə və əksər çoxhüceyrəli orqanizmlərdə ziqotun sitoplazmasına mitoxondri verilməsində spermanın payı həddən artıq azdır (əgər varsa) və virtual olaraq embriondakı bütün mitoxondri spermadan deyil yümürtadan törəmişdir. Siçanda aparılan tədqiqatlar göstərdi ki, mtDNT-nin 99.99 faizi irsən anadan ötürülmüşdür, amma çox kiçik hissə (0.01 faiz) erkək valideyndən törəmişdir. Ali bitkilərdə, mtDNT yalnız birvalideyinli törəmə olub atadan (tozcuq) deyil, yalnız ana valideyndən (yumurtadan) törəmişdir.

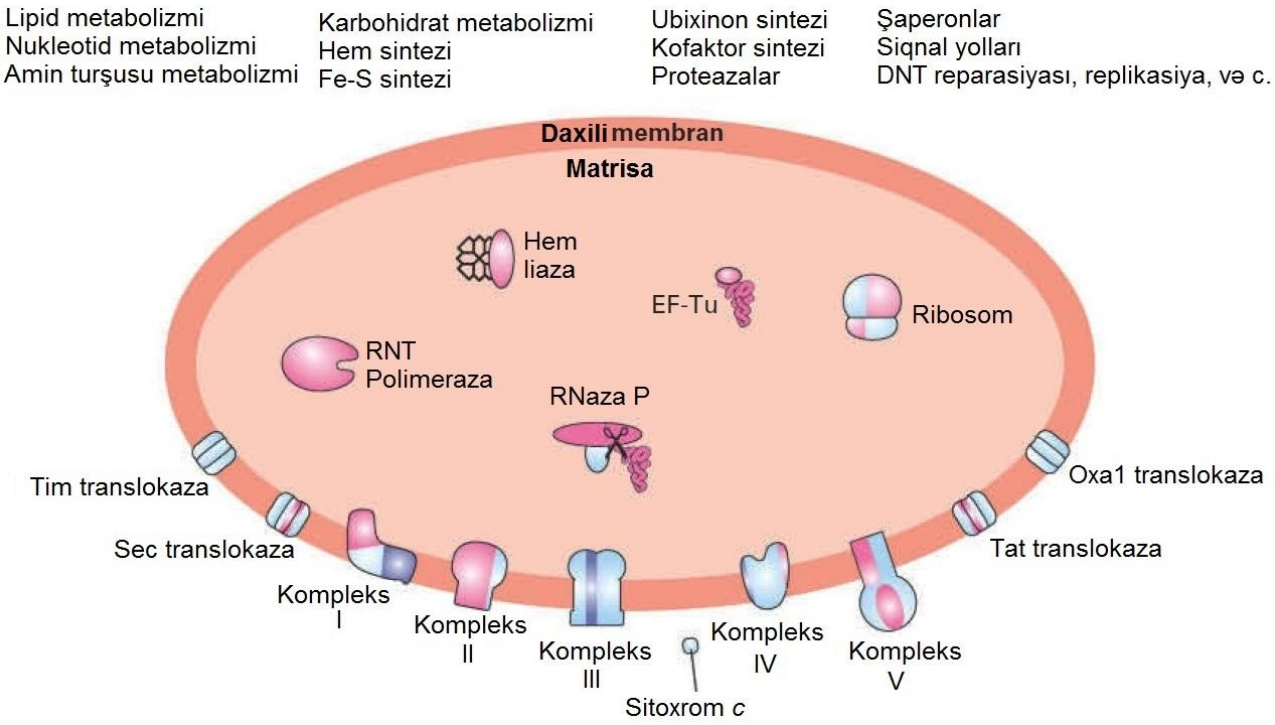
mtDNT-nin Ölçüsü, Quruluşu və Kodlaşdırma Qabliyyəti Orqanizmlər Arasında Əhəmiyyətli Dərəcədə Dəyişir

Təəccüblidir ki, mtDNT-nin ölçüsü, onun kodlaşdırdığı zülalların təbiəti və sayı, hətta mitoxondrial genetik kodun özü müxtəlif orqanizmlər arasında güclü şəkildə fərqlənir. Əksər çoxhüceyrəli orqanizmlərin mtDNT-ləri təxminən 16 kə dairəvi molekullardır, intronsuz genləri kodlaşdırırlar və qismən hər iki DNT zəncirində düzlənmişlər. Onurğalıların mtDNT-si mitoxondrial ribosomlarda tapılmış iki rRNT-ni, mitoxondrial mRNT-nin translyasiyasında iştirak edən 22 tRNT-ni və elektron nəqliyyatında və ATP sintezində iştirak edən 13 zülalı kodlaşdırır. Məlum olan ən kiçik mitoxondrial genom insanlarda malariya əmələ gətirən birhüceyrəli obliqat hüceyrədaxili parazit olan *Plazmodium* cinsində tapılmışdır. *Plazmodium* mtDNT-lər təxminən 6 kə bərabərdir, üç zülalı və mitoxondrial rRNT-ləri kodlaşdırır.

İndi artıq çoxsaylı müxtəlif metazoanların mitoxondrial genomunun ardıcıllığı oxunmuşdur, aşkar edilmişdir ki, mtDNT-lər bütün bu mənbələrdən mitoxondri ribosomlarında sintez olunan vacib mitoxondrial zülalları kodlaşdırır (Şəkil 12-10). Bu vaxta qədər identifikasiya olunmuş, mitoxondridə sintez olunan əksər polipeptidlər elektron nəqliyyatında və ya ATP sintezində istifadə olunan çoxsubvahidli komplekslərin subvahididirlər. Amma, yuxarıda Şəkil 12-10 və cədvəl 12-1-də göstərilən proseslərdə iştirak edən, mitoxondridə lokalizasiya olunan əksər zülallar nüvə genləri ilə kodlaşdırılır, sitozol ribosomlarında sintez olunur və Fəsil 13-də müzakirə olunan proseslə orqanoidə daşınır



ŞƏKIL 12-9 Mayada mtDNT petit mutasiyanın sitoplazmatik irsiyyəti. Petit-ştammlı mitoxondri oksidativ fosforlaşmada qüsurludur, mtDNT-də silinməyə malikdir. (a) Haploid maya hüceyrələri meyoza gedən diploid hüceyrələri əmələ gətirmək üçün qovuşurlar, bu zaman valideyin xromosomların və mtDNT-yə malik olan mitoxondrilərin seqreqasiyası baş verir. Qeyd edək ki, nüvə DNT-sində genlər üçün allellər (qırmızı və mavi rənglərlə boyanmış böyük və kiçik nüvə xromosomları ilə təmsil olunur) meyoz zamanı 2:2 kimi seqreqasiya edir (bax Şəkil 6-5). Əksinə, normal halda hər bir maya hüceyrəsi 50-ə qədər mitoxondrial DNT molekuluna malik olduğundan, meyozun əsas məhsulları həm normal həm də petit mtDNT-lərə malik olurlar və tənəffüs qabliyyətli olurlar. (b) Bu haploid hüceyrələr mitoz yolu ilə bölünüb çoxala bildiyindən sitoplazma (mitoxondri də daxil olmaqla) qız hüceyrələr arasında təsadüfi paylanırlar. Arabir, yalnız *petit* mtDNT-yə malik olan hüceyrə yaranır və koloniyanı əmələ gətirir. Beləliklə, bu cürə petit hüceyrələrin əmələ gəlməsi istənilən hər hansı bir nüvə genetik markerdən asılı deyil.



ŞƏKİL 12-10 Mitoxondrial DNT-də kodlaşdırılan zülallar və onların mitoxondrial prosesdə iştirakı. Yalnız mitoxondrial matrisa və daxili membran göstərilmişdir. Mitoxondri komponentlərinin çoxu nüvə genomi (mavi) ilə kodlaşdırılır, bənövşəyi rəngdə işarələnənlər bəzi eukaryotlarda mtDNT ilə, digər eukaryotlarda isə nüvə genomu ilə kodlaşdırılır, halbuki kiçik bir hissə mütləq şəkildə mtDNT tərəfindən kodlaşdırılır (narıncı). Sırf nüvə ilə kodlaşdırılan komponentlərə malik olan mitoxondrial proseslər yuxarıda göstərilmişdir. I-V komplekslər elektron nəqliyyatında və oksidativ fosforlaşmada iştirak edirlər. Tim, Sec, Tat və Oxa1 translokazalar zülalların importunda və eksportunda, həmçinin zülalların daxili membrana keçirilməsində (bax Fəsil 13) iştirak edirlər. RNaza P ribozimdir və tRNT-lərin 5′ ucunu prosess edir (Fəsil 10-da müzakirə olunmuşdur). Qeyd etmək lazımdır ki, eukaryotların böyük çoxluğu, göstərildiyi kimi, çoxsubvahidli kompleks I-ə malikdir, bunlardan üç subvahid dəyişilməz şəkildə nüvədə kodlaşdırılır. Amma, çox az orqanizmlərdə (*Saccharomyces, Schizosaccharomyces,* və *Plasmodium*), bu kompleks nüvədə kodlaşfırılan tək-polipeptidli fermentlə əvəz olunmuşdur. Bax G. Burger et al., 2003, *Trends Genet.* **19**:709.

Bitkilərin mitoxondrial genomu metazoanlarınkindən bir neçə dəfə böyükdür. Məsələn, xardal alaq otunun nümayəndəsi olan *Arabidopsis thaliana* bitkisinin 366 kə mtDNT molekulu var. Ən böyük mitoxondrial genom, təxminən 2 Mə bostan bitkilərində (məsələn, yemişdə və xiyarda) tapılmışdır. Bitki mtDNT-nin əksər hissəsi zülal kodlaşdırmır, əksinə uzun intronlardan, psevdogenlərdən, mitoxondrial kompartmentdə məhdudlaşan mobil DNT elementlərindən və ehtimal ki, təkamül dövründə bitki mitoxondrial genomuna daxil olmuş xarici (xloroplast və virus) DNT hissələrindən ibarətdir. İkiləşmiş (duplikat) ardıcıllıqların da bitki mtDNT molekulunun uzunamasında böyük rolu var.

Müxtəlif orqanizmlərin mtDNT-lərində genlərin sayındakı fərqlər yəqin ki, təkamül dövründə mitoxondri ilə nüvə arasında DNT keçidini əks etdirir. Bu keçid üçün birbaşa sübutlar yaxın növlər arasında bir sıra zülalların bəzi növlərdə mtDNT tərəfindən kodlaşdırıldığı halda digər növlərdə nüvə genomu tərəfindən kodlaşdırılması müşahidələrindən gəlir. Bu fenomenin parlaq nümunəsinə *coxII* genin ekspressiyası daxildir, bu gen mitoxondridə elektron nəqliyyat zəncirində (aşağıda müzakirə olunur) iştirak edən IV kompleksi təşkil edən sitoxrom *c* oksidazanın 2-ci subvahidini kodlaşdırır. Bu gen bütün öyrənilmiş çoxhüceyrəli bitkilərdə mtDNT-də tapılmışdır, yalnız maş və soya paxlaları daxil olmaqla oxşar paxlalılar istisna təşkil edir, bunlarda *coxII* gen nüvə genidir. Maş paxlasında mtDNT-də *coxII* tamamilə itmişdir, amma çoxsaylı mutasiyaların toplandığı qüsurlu *coxII* psevdogen soya mtDNT-sində tapılmışdır.

Bitki mitoxondrial genlərin bir-çox RNT transkriptləri əsasən seçilmiş C qalıqlarının U qalıqlarına və arabir U qalığının C-yə fermentlə-kataliz olunan çevrilməsi ilə redaktə olunur. (RNT redaktəsi Fəsil 10-da müzakirə olunur.) Həqiqətən də, maş paxlasının nüvə *coxII* geni redaktə olunmamış mtDNT-nin kodlaşdırdığı *coxII* geni ilə müqayisədə, funksional *coxII* mtDNT-yə malik olan başqa paxlalılardakı redaktə olunmuş *coxII* mtDNT-nin kodlaşdırdığı mRNT transkriptinə daha çox uyğun gəlir. Bu müşahidələr güclü şəkildə sübut edir ki, maş paxlasının təkamüli zamanı *coxII* geni redaktə olunmuş mRNT intermediatlarının iştirak etdiyi proseslə mitoxondridən nüvəyə keçmişdir. Yəqin ki, bu keçmədə geriyə transkripsiya və nüvə xromosomuna insersiya mexanizmi iştirak etmişdir. Bu proses nüvədə kodlaşdırılan mRNT-dən yaranan prosessinq olunmuş psevdogenlərin nüvə genomunda yarandığı prosesə oxşar olmalıdır.

Eukaryotlar arasında mitoxondrial genomun ölçüsündə olan böyük fərqlərdən başqa mtDNT-lərin quruluşu da güclü şəkildə dəyişilir. Yuxarıda qeyd olunduğu kimi, əksər heyvanlarda mtDNT 6-16 kə ölçüdə dairəvi molekuldur. Amma, *Tetrahymena* protist kimi çox orqanizmlərin mtDNT-si, xətti başdan-quyruğa təkrarlara malikdir. Ən müstəsna nümunələrdə,

Ameobidium parasiticum protistin mtDNT-si bir neçə yüz qısa xətti molekullardan təşkil olunmuşdur. *Trypanosoma*-nın mtDNT-si isə *maksidairələr*də (*maxicircles)* kodlaşdırılan, mitoxondrial mRNT-lərin ardıcıllığının redaktə edilməsində iştirak edən bələdçi RNT-ni kodlaşdıran minlərlə *minidairələrin* birləşdirilmiş (aralarında bağlanmış) çoxsaylı *maksidairələrindən* ibarətdir.

Mitoxondrial Genlərin Məhsulları Eksport Olunmur

Artıq məlum olduğu kimi, mtDNT-nin bütün RNT transkriptləri və onların translyasiya məhsulları onların istehsal olunduqları mitoxondridə qalırlar və bütün mtDNT ilə kodlaşdırılan zülallar mitoxondrial ribosomlarda sintez olunurlar. Mitoxondrial DNT mitoxondrial ribosomları əmələ gətirən rRNT-ləri kodlaşdırır, hərçənd ki, əksər ribosomal zülallar sitozoldan import olunurlar. Heyvanlarda və göbələklərdə, mitoxondridə zülal sintezi üçün istifadə olunan bütün tRNT-lər də mtDNT-lər tərəfindən kodlaşdırılır. Amma, bitkilərdə və bir çox metazoanlarda mitoxondrial tRNT-lərin çoxu nüvə DNT-si tərəfindən kodlaşdırılır və mitoxondriyə import olunur.

Mitoxondrinin bacterial əcdadını əks etdirməklə mitoxondrial ribosomlar bacterial ribosomlara bənzəyir və eukaryotların sitozol ribosomundan RNT və zülal tərkibinə görə, ölçülərinə və müəyyən antibiotiklərə olan həssaslığına görə fərqlənir (bax Cədvəl 5-3). Məsələn, xloramfenikol orqanizmlərin çoxunda bacterial və mitoxondrial ribosomlarda zülal sintezini blok edir, amma eukaryotlarda sitozol ribosomlarında zülal sinetzini ingibirləşdirən tsikloheksimid mitoxondrial ribosoma təsir etmir. Mitoxondrial ribosomların xloramfenikolun daxil olduğu antibiotiklərin aminoqlikozid sinifinə olan belə həssaslığı xəstələrdə bu antibiotikin əmələ gətirəcəyi toksikliyin əsas səbəbidir.

Mitoxondri *Rikettsia*-Bənzər Bakteriyanın Daxil Olduğu Vahid Endosimbiotik Hadisə ilə Yaranmışdır

Təkamülün erkən dövründə eukaryotlardan ayrılmış birhüceyrəli protistlər də daxil olmaqla müxtəlif eukaryotlardan ayrılmış mtDNT ardıcıllığının analizi mitoxondrinin vahid orqanizm olması ideyasını möhkəm şəkildə təsdiq edir. Böyük ehtimalla mitoxondri bakterial simbiotlardan əmələ gəlmişdir, onların daha yaxın olan qohumları *Rickettsiaceae* qrupudur. Bu qrupda olan bakteriyalar obliqat hüceyrədaxili parazitlərdir. Beləliklə, mitoxondrinin əcdadı da hüceyrədaxili həyat tərzinə malik olub, onu hüceyrədaxili simbiotunu əmələ gətirmək üçün yaxşı mövqedə yerləşdirmişdir. Bu vaxta qədər tapılmış ən böyük sayda kodlaşdırıcı genləri olan mtDNT *Reclinomonas americana* protist növündə olmuşdur. Bütün başqa mitoxondrial genomlar *R. americana* genlərinin yarımhissəsini təşkil edir, bu göstərir ki, onlar *R. Americana* ilə qohum olan ümumi əcdaddan törənmiş, keçən zaman müddətində silinmələr və ya nüvə genomuna ötürülmələr, ya da hər ikisi ilə mitoxondrial genlərin müxtəlif qruplarını itirmişlər.

mtDNT-si məhdud sayda genlərə malik olan orqanizmlərdə, bu orqanizmlərin daxil olduğu tipdən asılı olmayaraq, mitoxondrial genlərin eyni dəsti saxlanılmışdır (bax Şəkil 12-10, narıncı zülallar). Nəyə görə bu genlərin hamısının nüvəyə ötürülməməsinin bir fərziyyəsi ondan ibarətdir ki, onların kodlaşdırdığı polipeptidlər mitoxondrinin xarici membranını keçərək mitoxondri daxilinə kirmək üçün həddən artıq hidrofobdurlar, əgər onlar sitozolda sintez olunsaydılar geriyə mitoxondriyə import oluna bilməyəcəkdirlər. Eynilə, rRNT-lərin böyük ölçüsü onların nüvədən sitozolu keçərək mitoxondriyə daşınmasına mane olardı. Alternativ olaraq, bu genlər təkamül dövründə nüvəyə ona görə ötürülməmişdir ki, onların şəraitə cavab olaraq ekspressiyasının tənzimlənməsi fərdi mitoxondri daxilində sərfəli olmuşdur. Əgər bu genlər nüvədə yerləşsəydilər, hər bir mitoxondri daxilindəki şəraitin dəyişməsi mitoxondridə sintez olunan zülalların ekspressiyasına təsir edilə bilməzdi.

Cədvəl 12-2 Standart genetik kodun mitoxondridə dəyişməsi

Kodon	Mitoxondri					
	Standart kod*	Məməlilər	*Drosophila*	*Neurospora*	Maya	Bitkilər
UGA	Stop	Trp	Trp	Trp	Trp	Stop
AGA, AGG	Arg	Stop	Ser	Arg	Arg	Arg
AUA	Ile	Met	Met	Ile	Met	Ile
AUU	Ile	Met	Met	Met	Met	Ile
CUU, CUC, CUA, CUG	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu

*Nüvədə kodlaşdırılan genlər üçün

Mənbə: Verilənlər S. Anderson et al., 1981, *Nature* **290**:457; P. Borst, in *International Cell Biology 1980–1981*, H. G. Schweiger, ed., Springer-Verlag, p. 239; C. Breitenberger and U. L. Raj Bhandary, 1985, *Trends Biochem. Sci.* **10**:478; V. K. Eckenrode and C. S. Levings, 1986, *In Vitro Cell. Dev. B. 22*:169; and J. M. Gualber et al., 1989, *Nature 341*:660.

Mitoxondrial Genetik Kod Standart Nüvə Kodundan Fərqlənir

Heyvanların və göbələklərin mitoxondrilərinin istifadə etdikləri genetik kod bütün prokariotların və eukaryotların nüvə genlərinin istifadə etdikləri koddan fərqlənir, hətta müxtəlif

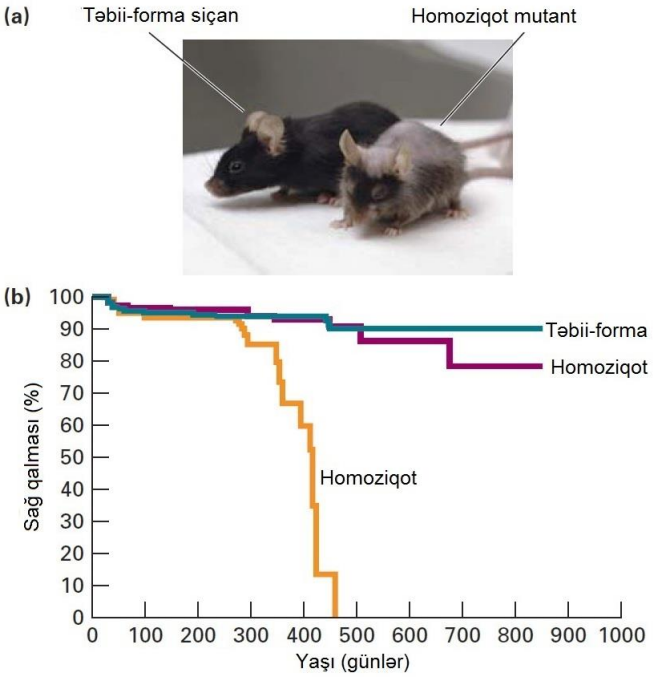
növlərin də mitoxondriləri arasında da fərqlənir (Cədvəl 12-2). Təkamül prosesində bu cürə fərqlərin necə yarandığı sirr olaraq qalır. Məsələn, normal halda UGA stop kodondur, amma insanın və göbələklərin mitoxondrial translyasiya sistemində triptofan kimi oxunur, amma bitkilərin mitoxondrisində UGA hələ də stop kodon kimi tanınır. AGA və AGG standart nüvə kodonunda arginin kodudur, göbələk və bitki mtDNT-sində də arginini kodlaşdırır, amma məməlilərin mtDNT-sində stop kodon, *Drosophyla* mtDNT-sində serini kodlaşdırır.

Cədvəl 12-2-də göstərildiyi kimi, bitki mitoxondrisi görünür standart genetik koddan istifadə edir. Amma, bitki mitoxondri zülallarının aminturşu ardıcıllıalarının bitki mtDNT ardıcıllıqları ilə müqayisəsi göstərir ki, CGG arginini ("standard" amin turşusu) ya da triptofanı kodlaşdırır. Bitki mitoxondri kodunun bu qeyri-müəyyənliyi mitoxondri RNT transkriptlərinin sitozin qalıqlarını urasil qalıqlarına çevirən RNT redaktəsi ilə izah olunur. Əgər, CGG ardıcıllığı UGG ilə redaktə olunarsa, kodon UGG üçün standard amin turşusu triptofanı təyin edir, halbuki redaktə olunmamış CGG kodonlar standard arginini kodlaşdırır. Beləliklə bitkilərdə translyasiya sistemi standart genetic koddan istifadə edir.

Mitoxondrial DNTdə Mutasiya İnsanlarda Bir Sıra Genetik Xəstəliklərə Səbəb Olur

mtDNT-dəki mutasiyanın əmələ gətirdiyi xəstəliyin ağırlığı mutasiyanın təbiətindən və spesifik hüceyrə tipində olan mutant və təbii-forma mtDNT-nin nisbi miqdarından asılıdır. Ümumiyyətlə mtDNT-də mutasiya tapılanda hüceyrə təbii-formalı və mutant mtDNT qatışığına malik olur – bu vəziyyət *heteroplazmiya* kimi məlumdur. Hər dəfə məməlilərin somatik və rüşeym-xətti hüceyrələri bölünərkən mutant və təbii-forma mtDNT-lər, maya hüceyrələrində göründüyü kimi (bax Şəkil 12-9), qız hüceyrələrə təsadüfi seqreqasiya edirlər. Beləliklə, bir generasiyadan və bir hüceyrə bölünməsindən digərinə fluktuasiya edən mtDNT genotipi böyük üstünlüklə təbii-formaya və ya böyük üstünlüklə mutant formaya doğru sürüklənə bilər. Məməlilərin mitoxondrisinin replikasiyası və böyüməsi üçün tələb olunan bütün fermentlər, məsələn mitoxondrial DNT və RNT polimerazalar nüvədə kodlaşdırılıb sitozoldan import olunduğundan mutant mtDNT "replikasiya çatışmazlığında" olmamalıdır, mtDNT-də böyük silinmələrə malik olan mutantlar hətta selektiv üstünlüklərdə ola bilirlər, çünki onlar daha sürətlə replikasiya edə bilirlər.

Son zamanların tədqiqatları göstərir ki, mtDNT-də mutasiyaların toplanması məməlilərdə qocalmanın əhəmiyyətli komponentlərindəndir. Müşahidə olunmuşdur ki, mtDNT-də mutasiyalar uzun zaman müddətində toplanır, təxminən ona görə ki, məməlilərin mtDNT-si DNT zədələnməsinə cavab olaraq bərpa (reparasiya) olunmur. Bu fərziyəni öyrənmək üçün tədqiqatçılar "nok-in" metodundan istifadə edərək siçanda normal doğruluğu oxuyan fəallığa malik olan mitoxondrial DNT polimerazanı kodlaşdıran nüvə genini (bax Şəkil 5-33) doğruluğu oxumaq qabliyyətini itirmiş DNT polimerazanı kodlaşdıran mutant genlə əvəz etdilər. mtDNT-də mutasiyalar homoziqot mutant suçanda təbii-formalı siçana nisbətən daha sürətlə toplanır və mutant siçan daha sürətlə qocalır və təbii formalı siçandan daha tez ölür (Şəkil 12-11). Belə ehtimal olunur ki, qismən mutasiyanın toplanmasına və reaktiv oksigen nümunəsinin yaratdığı zədələnməyə görə, qocalma ilə müşayət olunur mitoxondrinin funksiyasının itirilməsi qocalmanı sürətləndirə və həyat dövrünü qısalda bilir. Amma, mitoxondrinin yanlış funksiyasının, qocalmanın və uzunömürlülüyün bir-biri ilə necə əlaqəli olmasının anlaşılması üçün əlavə tədqiqatlar tələb olunacaq.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 12-11 Mitoxondrial DNT polimeraza üçün doğruluğun oxunması qüsurlu olan siçan vaxtından əvvəl qocalmanı nümayiş etdirir. "Nok-in" siçan xətti 6-cı fəsildə müzakirə olunan metodla mitoxondrial DNT polimerazanı kodlaşdıran gendə polimerazanın doğruluğu oxuma qabliyyətini fəalsızlaşdıran aspartatdan-alaninə-mutasiya (D257A) yolu ilə hazırlandı. (a) Təbii formalı və homoziqot mutant siçan 390 gün (13 ay) yaşında. Mutant siçan yaşlı siçanın (>720 gün və ya 24 ay yaşında) bir sıra əlamətlərini nümayiş etdirir. (b) Təbii formalı (+/+), heteroziqot (D257A/+) və homoziqot (D257A/D257A) siçanların sağ qalması qrafiki. [(a) hissəsi Jeff Miller/University of Wisconsin-Madison. (b) hissəsi G. C. Kujoth et al., 2005, *Science* **309**:481.]

Kiçik istisna ilə insan hüceyrələrinin hamısının mitoxondrisi var, amma mitoxondridə mutasiya yalnız bəzi toxumalara təsir edir. Ən çox təsir olunan toxumalar oksidativ fosforlaşma yolu ilə ATP-ə yüksək dərəcədə ehtiyacı olanlar və mtDNT-nin əksər hissəsini və ya hamısını hüceyrədə funksional mitoxondri zülallarını sintez etmək üçün tələb edən toxumalardır. Məsələn, *Leber irsi optik neyropatiya*nın (optik sinirlərin degenerasiyası) yaranmasına mitoxondridə ATP istehsalı üçün (bax aşağıda) lazım olan NADH-CoQ reduktazanın (kompleks I) 4-cü subvahidini kodlaşdıran mtDNT genində olan missens mutasiya səbəb olur. mtDNT-də bir sıra

böyük silinmələr başqa xəstəliklər dəstinin də yaranmasına səbəb olur, bunlardan gözün qüsuru ilə xarakterizə olunan *xronikı proqressiv xarici oftalmoplegiya*, gözün qüsuru və ürəyin qeyri normal döyünməsi ilə xarakterizə olunan *Karn-Sayre sindromu* və mərkəzi sinir sisteminin degenerasiyası bunlara aiddir. Üçüncü vəziyyət, "cırılmış-qırmızı" ("ragged red") əzələ liflərinə (düzgün toplanmamış mitoxondriyə malik olan) və bununla bağlı nəzarət olunmayan kəskin qırıq-qırıq hərəkətlər, mitoxondrial lizin tRNT-dəki TΨCG ilgəkdəki tək mutasiya nəticəsində əmələ gəlir. Bu mutasiya bir sıra mitoxondrial zülalların translyasiyasının ingibirləşməsinə səbəb olur.

Mitoxondrilər Dinamik Orqanoidlər Olub Bir-Biri ilə Əlaqədə Olurlar

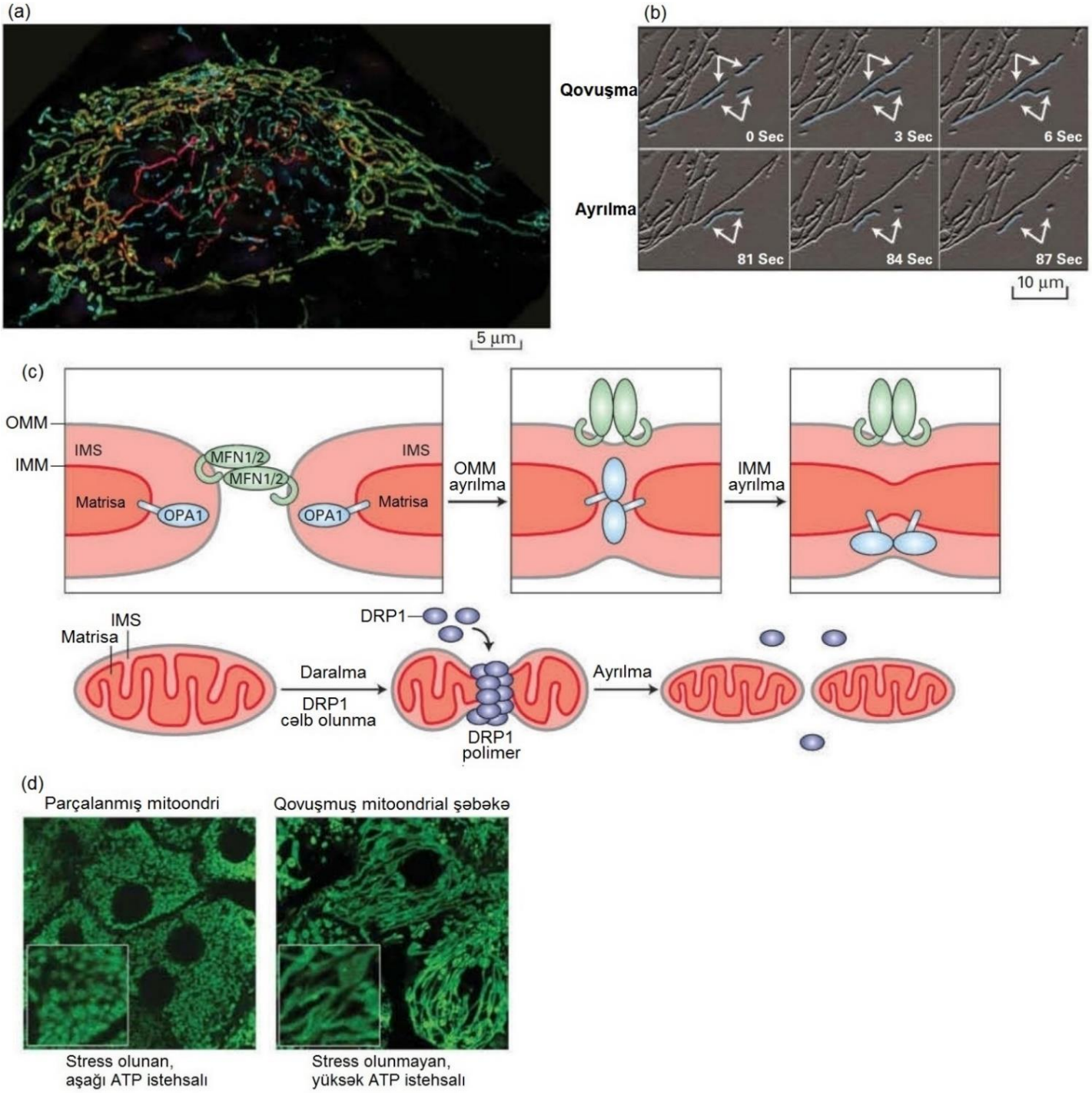
Canlı hüceyrələrdə fluoressent nişanlanmış mitoxondrilərin analizi göstərdi ki, mitoxondrilər müxtəlif tipli hüceyrələrdə yüksək dərəcədə dinamikdirlər. Onlar tez-tez qovuşur (birləşir) və ayrılırlar (hissələrə bölünürlər), bu da müxtəlif hüceyrə tiplərində görünən mitoxondrial morfologiyaların geniş tipləri hesab edilə bilən boruvari, bəzi hallarda isə şaxələnmiş şəbəkəni əmələ gətirilər (Şəkil 12-12a və b). Fərdi mitoxondrilər birləşəndə iki membranın hər biri (daxili membran daxili membran ilə, xarici membran isə xarici membran ilə) qovuşur və onların hər birinin fərqli daxili komponentləri qarışır (matrisa matrisa ilə, membranlararası mühit membranlararası mühitlə). Təkamülcə konservativ olan dörd GTP hidroliz edən (GTP-aza) fermentlər — MFN1 (mitofuzin 1), MFN2 (mitofuzin 2), OPA1 və DRP1 — bu membranların qovuşmasında və ayrılmasında kritik rol oynayırlar (Şəkil 12-12c). Bu fermentlər GTP-azaların dinamin ailəsinin nümayəndələridir. Bu ailənin ilk identifikasiya olunan nümayəndəsi dinamin endositik qovucuqların plazma membranından qopub ayrılması zamanı lazım olan, müqayisə edilə bilən membran bölünməsi reaksiyasına vasitəçilik edir (bax Fəsil 14). Bu GTP-azaları kodlaşdıran genlərin bir neçəsində mutasiya daxili membranın elektrik potensialının düzgün saxlanılması və quruluşu kimi mitoxondrial funksiyaları qıra bilir, nəticədə kəsiklərə ayrılmış və ya çox böyümüş mitoxondri yaranır, bu da insan xəstəliklərinə səbəb olur. İrsən keçirilmiş autosomal neyro-əzələ xəstəliyi Şarko-Mari-Tuta 2A yarımtipi MFN2-də periferial sinir funksiyasında, xüsusən də ayaqlarda və əllərdə qüsurlara və proqressiv əzələ zəifliyinə səbəb olan, funksiyanın-itirilməsi mutasiyası nəticəsində yaranır. OPA1-də göz qişasındakı sinirlərə təsir edən mutasiyalar autosomal dominant optik atrofiya ilə bağlıdır.

Mitoxondrial qovuşmanın və ayrılmanın dəyəri nədir? Göstərilmişdir ki, qovuşma hüceyrə daxilində mitoxondrilərin nisbi homogenliyinin qorunub saxlanılmasına kömək edir. Fərdi mitoxondrilərin bəzi hissələri zərərli modifikasiyalara və ya əhəmiyyətli komponentlərin itirilməsinə məruz qalır, başqa mitoxondrilərlə qovuşma bu komponentlərin bölüşməsinə və bərpasına imkan verir. Hüceyrələrin və orqanizmlərin qovuşma maşınını kodlaşdıran genlərin mutasiyaları ilə öyrənilməsi göstərir ki, qovuşma həmçinin mitoxondrinin hüceyrə daxilində düzgün lokalizasiyasına, düzgün morfologiyanın və kristaların təşkilinin saxlanılmasına, mitoxondrial DNT-nin paylanmasına və tam funksional elektron nəqliyyatının saxlanılmasına kömək edir.

Çoxsaylı funksiyalar mitoxondrilərin ayrılması ilə həyata keçirilir. Məsələn, mitoxondrial ayrılma xüsusilə hüceyrə bölünən zaman fəal olur (xüsusilə hüceyrə tsiklinin G_2 və M fazaları zamanı; bax Fəsil 19). Bunun nəticəsində ayrılma ilə əmələ gəlmiş çoxsaylı diskret mitoxondrilər asanlıqla bərabər şəkildə qız hüceyrələrin daxilinə çatdırılır. Mitoxondrilər onların hüceyrə daxili düzgün paylanmasını təşkil etmək üçün motor zülallar vasitəsilə mikroborucuqlar və mikrofilamentlər daxil olmaqla sitoskelet filamentlər boyunca daşına bilirlər (bax Fəsil 17). Bundan başqa, ayrılma mitoxondrinin qüsurlu seqmentlərini öz aralarında birləşmiş sağlam mitoxondrial şəbəkədən seçib atmaqla keyfiyyət nəzarətinin çox güclü mexanizmini təmin edir. Böyük mitoxondrial şəbəkənin bir hissəsi zədələnəndə və ya funksiyasını itirəndə, məsələn, yüksək miqdarda reaktiv oksigen nümunələri yarandıqda (sonra müzakirə olunur) və ya mitoxondrial DNT-də mutasiya baş verdikdə, ayrılma funksiyadan düşmüş seqmentləri sağlam seqmentlərdən ayıraraq atır.

Hüceyrələrin mitoxondrial şəbəkənin zədələnmiş və ya funksiyasını itirmiş seqmentlərini tanımaq qabliyyəti vardır, onları şəbəkədən ayırdıqdan sonra membranla əhatə edir və parçalanmaq üçün lizosomlara daşıyır. Mitoxondrinin *mitofaqiya* ("mitoxondrini yemək") adlanan belə dağıdılması *autofaqiya* ("özünü yemək") adlanan ümumi prosesin bir hissəsidir, bu yolla hüceyrələr membranı udur və orqanoidləri və sitozolun hissələrini dağıdır (bax Fəsil 14). Çox təccübləndiricidir ki, irsən keçirilmiş erkən başlayan Parkinson xəstəliyi mitofaqiyanı həyata keçirən zülalları kodlaşdıran iki gendəki mutasiya nəticəsində baş verir. Bu zülallar PINK1 (kinazadır) və Parkindir (kiçik zülal ubikvitini kovalent rabitə ilə yaxınlıqdakı zülala bərkitməklə onu proteosomlarda parçalanmağa hədəf edən E3 ubikvitin liqaza; bax Fəsil 3). Sağlam mitoxondridə PINK1 mitoxondri matrisasına import olunur. Mitoxondri zədələnəndə və ya funksiyasını itirdikdə, PINK1 matrisaya daxil ola bilmir və xarici mitoxondrial membranda qalır, burada o sitozoldakı Parkin zülalını zədələnmiş seqmentə cəlb edir. Parkin fəallaşır və xarici membran zülallarını ubikvitinləşdirir, beləliklə onları parçalanmağa hədəf edərək mitofaqiyanı induksiya edir. Hüceyrənin xarici mühitində qeyri adekvat miqdarda oksigen olduqda (hipoksia), müəyyən fermentlər xarici mitoxondrial membranda zülalları modifikasiya edərək mitofaqiyanı induksiya edirlər. PINK1 və Parkin-in mitofaqiyadan-asılı olan və mitofaqiyadan-asılı olmayan yollarla mitoxondrial homeostaza təsiri ilk dəfə *Drosophila melanogaster* milçəyinin genetik tədqiqatlarında aşkar edilmişdir.

Mitoxondrial dinamizm, qeyd olunması lazım olan əlavə xüsusiyyətlərə malikdir. Mitoxondrial quruluş və funksiya hüceyrənin metabolik vəziyyətinə cavab olaraq dəyişilə bilir. Məsələn, siçovulun qaraciyər hüceyrələrinin (hepatositlər) bədəndən ayırılaraq kulturaya keçirilməsi hüceyrələrdə stress yaradır və onların depolyarlaşması ilə nəticələnir (onların bəzi epiteli xüsusiyyətlərinin itirilməsinə səbəb olur; bax Fəsil 20). Bu hüceyrələr öz mitoxondrilərində oksidativ fosforlaşma yolu ilə az ATP yaranması ilə müşayət olunan fraqmentasiyanı nümayiş etdirirlər (Şəkil 12-12d, *solda*). Hüceyrələr hüceyrə kulturasının artmasını tənzimləyəndə, onlar polyarlaşırlar (daha çox qaraciyərdəki hepatositlərə oxşar olan morfologiya



EKSPERIMENTAL ŞƏKIL 12-12 Mitoxondri çox tez qovuşmaya və ayrılmaya məruz qalır. (a) İnsanın mitoxondri-spesifik fluoressent boya (Mito Traker yaşılı) ilə nişanlanmış HeLa hüceyrələrinin üç-ölçülü quruluşu işıqlandırma fluoressensiya mikroskopiyası (hüceyrədən 6.1 µm-qalınlıqda kəsik göstərilir) vasitəsi ilə təsviri alınmışdır. Qövuşmuş və şaxələnmiş mitoxondrilərin şəbəkəsi sitoplazmada nüvədən yuxarıda və ya aşağıda müşahidə olunan yalnız bir neçə mitoxondri ilə görünür (mərkəzi boyanmamış tünd oval). Mitoxondri içərisində görünən şırımlı quruluşun identifikasiyası məlum deyil. Mitoxondrilərin hüceyrənin yapışdığı səthə nisbətdə mövqeyini təyin etmək üçün onlar süni rənglərlə göstərilir (mavi daha yaxın olanlar, qırmızı isə daha uzaq olanlardır). (b) Canlı normal siçan embrionun fibroblastında fluoressent zülalla nişanlanmış mitoxondri zaman-fasilə fluoressent mikroskopiyası ilə müşahidə olunmuşdur. Qovuşmaya məruz qalan (*yuxarıda*) və ya ayrılan (*aşağıda*) bir sıra mitoxondrilər süni olaraq mavi rənglə və oxlarla qeyd olunmuşdur. (c) Mitoxondrilərin qovuşması (*yuxarıda*) və ayrılması (*aşağıda*) GTP-aza fermentlər dəsti (MFN1, MFN2, OPA1 və DRP1) ilə həyata keçirilir. İnteqral membran zülalları MFN1 və MFN2 (MFN1/2) xarici mitoxondrial membranların (OMM) qovuşmasında vasitəçilik edir, bunun ardınca da daxili mitoxondrial membranın (IMM) qovuşması inteqral membran zülalı OPA1 vasitəsi ilə baş verir. Matrisa və daxili membran boşluğu (IMS) fərqli qalırlar. Həll olan sitozol GTP-aza DRP1 mitoxondrinin səthindəki məhdud bir sayta cəlb olunur, burada DRP1 polimerlər membranı parçalayır və ayırılmaya səbəb olurlar. DRP1-in müxtəlif post-translyasiya modifikasiyaları ayırılmanı tənzimləyir. (d) (*Solda*) Siçovulun qara ciyər hüceyrələri (hepatositlər) qaraciyərdən ayrıldıqdan və hüceyrə kulturasına keçirildikdən bir gün

sonra stress olunmuş və depolyarlaşmışdır (epiteli hüceyrələrinin bir sıra morfoloji və biokimyəvi xassələri yox olmuşdur, bax Fəsil 20), aşağı səviyyədə oksidativ fosforlaşmaya və ATP istehsalına malik olmuşdur, mitoxondriləri fraqmentlərə ayrılmışdır (Mito Taker yaşılı ilə boyamaqla vizuallaşdırılmışdır). (*Sağda*) Altı gün kulturada çoxaldıqdan sonra, hepatositlər polyarlaşır, onların mitoxondriləri qovuşur, geniş şəbəkəni əmələ gətirir və hüceyrələr yüksək səviyyədə oksidadtiv fosforlaşmanı və ATP istehsalını nümayiş etdirirlər. Haşiyədə mitoxondrinin böyüdülmüş görünüşü verilir. [(a) Macmillan Publishers Ltd razılığı ilə Shao et al., "Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination," *Nature Methods*, **8**:12, 1044-1046-dən yenidən çap olunur, Fig. S4, 2011, nəzakətlə Mats Gustafsso-dan. (b) Elsevier razılığı ilə Chan D. C., "Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development," *Cell*, 2006, **125**(7):1241–52-dən modifikasiya olunaraq yenidən çap olunur. Razılıq Copyright Clearance Center, Inc vasitəsilə alınmışdır. (c) Məlumat P. Mishra and D. C. Chan, 2014, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**:634–646-dan. (d) *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 2013. **110**(18):7288-7293-dən, Şəkil. 3 Gün 1 və Gün 6. "Coordinated elevation of mitochondrial oxidative phosphorylation and autophagy help drive hepatocyte polarization," Fu, D. və başqaları tərəfindən, nəzakətlə Jennifer Lippincott-Schwartz.]

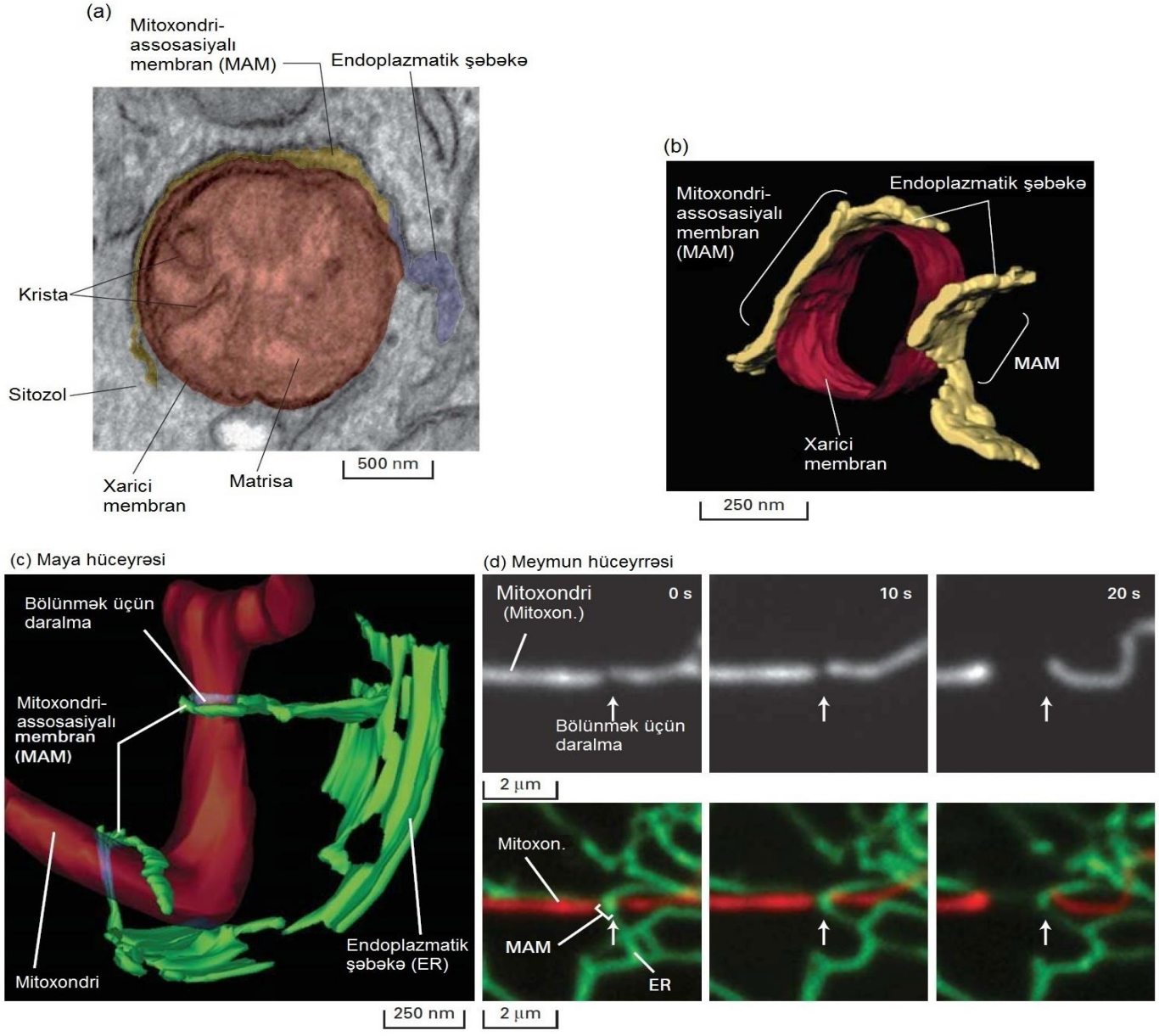
və biokimyaya malik olurlar), oksidativ fosforlaşma ilə mitoxondrial ATP sintezini yüksəldirlər və qovuşmuş mitoxondrilərin geniş şəbəkəsini nümayiş etdirirlər (Şəkil 12-12d, *sağda*). Qeyd etmək lazımdır ki, son zamanların təsqiqatları göstərdi ki, mtDNT və həqiqətən də, intakt mitoxondri Fəsil 20-də müzakirə olunan tunel nanoborucuqları adlanan membran borucuqları vasitəsilə bir hüceyrədən digərinə keçirilə bilirlər.

Mitoxondrilərə Endoplazmatik Şəbəkə Tərəfindən Birbaşa Əlaqə ilə Təsir Edilir

Mitoxondrial dinamikaya və bir çox mitoxondrial funksiyalara mitoxondri ilə endoplazmatik şəbəkə (ER) arasındakı birbaşa təmaslar təsir edir. Mitoxondri ilə xüsusi əlaqə rayonunu əmələ gətirən, mitoxondri ilə assosasiyada olan membranlar və ya MAM adlanan ER hissələri elektron mikroskopiya və fluoressent mikroskopiyadan istifadə etməklə vizuallaşdırıla bilər (Şəkil 12-13). Onların zülal və lipid tərkibi ER-in qalan bütün hissələrindən müəyyən qədər fərqlənir. Mayada ERMES (*ER m*itochondria *e*ncounter *s*tructure) adlanan zülal kompleksi guman olunur ki, MAM-ların mitoxondriyə geriyə dönən bağlanmasında iştirak edir. ERMES kompleks məməlilərdə yoxdur, mürəkkəb çoxhüceyrəli orqanizmlərdə MAM-ları mitoxondriyə bağlayan zülallar hələ məlum deyildir. Bağlayıcı zülallar MAM və xarici mitoxondrial membranı təxminən 10-30 nm məsafədə saxlayır.

MAM-lar mitoxondrial ayrılmalar da daxil olmaqla bir-çox hüceyrə proseslərinə əhəmiyyətli dərəcədə kömək edir (bax Cədvəl 12-1). MAM-mitoxondri əlaqələri mitoxondrial daralmanı inisiasiya edə bilir və membran ayrılmasını tamamlayan DRP1-in cəlb olunmasına kömək edir (bax Şəkil 12-12c). Mayada MAM trubkaların mitoxondri ətrafında tam ilgək əmələ gətirdiyi, mitoxondri daralmasını həyata keçirən sıxacı yaratdığı görünür (Şəkil 12-13). Məməlilərin hüceyrələrində, MAM-lar ayrılma saytında mitoxondriyə toxunurlar, amma onların mitoxondri ətrafında tam ilgək əmələ gətirdiyi görünmür (Şəkil 12-13d).

MAM-lar hüceyrədaxili kalsium və enerji metabolizmində də inteqral rol oynayırlar. Kalsium ionlarının qatılıqlarının hüceyrədaxili kompartmentlərdə – sitozol kalsiumu ($[Ca^{2+}]_s$), mitoxondrial kalsium ($[Ca^{2+}]_m$) və ER-də kalsium ($[Ca^{2+}]_{er}$) – dəyişməsi hüceyrə daxilində geniş müxtəliflikdə proseslərin nəzarət olunmasında istifadə edilir, bu proses *kalsium siqnalı* adlanır (bax Fəsil 15). Kalsium bir sıra hüceyrəxarici proseslərdə də, məsələn qan laxtalanmasında iştirak edən zülalların fəallığında da çox əhəmiyyətlidir. Mitoxondridaxili kalsium ionları mitoxondrilərin funksiyasının nəzarət olunmasında əhəmiyyətli rol oynayır və MAM kalsiumu ER-dən mitoxondriyə çatdırmaqla bu nəzarətin vasitəçisidir. Məsələn matrisada $[Ca^{2+}]_m$ artması mitoxondridə ATP istehsalını artıra bilir. Artan ($[Ca^{2+}]_m$ NAD^+-dan NADH əmələ gətirən mitoxondrial fermentlərin – piruvat dehidrogenaza (bax Şəkil 12-5) və α-ketoqlutaratla izositrat dehidrogenazanın (bax Şəkil 12-6 aşağıda) fəallığını birbaşa artırır. Bizim sonra bu fəsildə görəcəyimiz kimi, NADH ATP sintezi üçün yüksək enerjili elektronları təmin edir. Beləliklə, Ca^{2+}-un MAM-lardan mitoxondriyə aşağı-səviyyədə buraxılması hüceyrənin bazal və ya sakitlikdə olan vəziyyətində ATP sintezi üçün lazımdır. MAM-lar vasitəsilə Ca^{2+}-un artmış səviyyədə çatdırılması hüceyrələrin daha çox ATP tələbatı zamanı, məsələn əzələ hüceyrələri dartılmaq üçün stimullaşan zaman baş verir. Maraqlıdır ki, kalsium siqnalı həm əzələ dartılması üçün (bax Fəsil 17), həm də əlaqəli şəkildə bu dartılma üçün enerji mənbəyi kimi istifadə olunan ATP-nin mitoxondridə sintezini yüksəltmək üçün istifadə olunur. $[Ca^{2+}]_m$ artanda mitofaqiya induksiya oluna bilir. Həqiqətən də, mitoxondriyə kalsiumun həddən artıq daxil olması tənzimlənən hüceyrə ölümü yollularını fəallaşdıra bilir. Beləliklə, $[Ca^{2+}]_m$-in nəzarət olunması hüceyrələrin həyatına və ölümünə birbaşa nəzarət edə bilir.



EKSPERIMENTAL ŞƏKIL 12-13 Endoplazmatik şəbəkənin mitoxondri-assosasiyalı membranları (MAM) adlanan xüsusi rayonu mitoxondri ilə bir-başa əlaqədə olub onun formasına, funksiyasına və ayrılma saytlarına təsir edir. (a) Siçovulun qonur adipos (piy) toxuması kəsiyinin transmissiyalı elektron mikroskopunda (EM) təsviri. Endoplazmatik şəbəkənin (ER) lumeni MAM (sarı) və qeyri-MAM, toplam ER-i (mavi) göstərmək üçün saxta rənglənmişdir. MAM xarici mitoxondrial membrana sıx şəkildə yaxın yerləşmişdir. (b) Mitoxondrinin seqmentinin (qırmızı, yalnız xarici membranı göstərilir) və bitişik MAM-ın (sarı) üç-ölçülü modeli kultura olunan quş limfoma hüceyrə xətlərindən EM tomoqrafiyasından istifadə etməklə təyin edilmişdir (ardıcıl fərdi bölmələrdən üç-ölçülü təsvirin toplanması). (c) Mayada mitoxondrinin (qırmızı) və yaxınlıqdakı MAM-ların (yaşıl) EM tomoqrafiyasından istifadə etməklə alınan üç-ölçülü modeli. İki MAM domeni bəzi hallarda mitoxondrini bükə bilən ER trubkalardan alınmışdır, yuxarıdakı halda sıxaca-bənzər quruluşu əmələ gətirir, görünür mitoxondrini sıxaraq ayrılmaq üçün hazırlayır. (d) Cos-7 meymun hüceyrəsində canlı hüceyrənin fluoressensiya mikroskopiya təsviri mitoxondrini (yuxarı panellərdə ağ, eyni mitoxondri aşağı panellərdə qırmızı) və MAM-ı (aşağı panellərdə yaşıl) göstərir, təsvir eyni sahədən 10 saniyə intervalında götürülmüşdür. Ox mitoxondridə sıxılma və ayrılma saytını, və sıxılma/ayrılma saytındakı MAM-ı göstərir. MAM bu saytda daralmanı və ardınca da DRP1 vasitəsilə ayırılmanı yönəldir. Mitoxondrini və ER-i vizuallaşdırmaq üçün mitoxondri daxilində (qırmızı fluoressensiya) və ya ER-də (yaşıl fluoressensiya) spesifik olaraq toplanan iki fluoressent zülalı kodlaşdıran kDNT vektoru Cos-7 hüceyrələrə transfeksiya olundu. [(a) hissəsi de Meis L., Ketzer, L. A., da Costa R. M., de Andrade I. R., Benchimol M. (2010) Fusion of the Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial Outer Membrane in Rats Brown Adipose Tissue: Activation of Thermogenesis by Ca2+. *PLoS ONE* **5**(3): e9439.doi:10.1371/journal.pone.0009439. (b) hissəsi ©2006 Csordas et al. *The Journal of Cell Biology*. **174**:915–921. doi:10.1083/jcb.200604016. (c) hissəsi və (d) hissəsi razılıqla AAAS, from Friedman, J. R., et al., "ER tubules mark sites of mitochondrial division," *Science*, 2011, **334**(6054):358-62-dən yenidən çap olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc vasitəsilə alınməışdır.]

12.2 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSİYALARI

12.2 Mitoxondrinin quruluşu və fəaliyyəti

- Eukaryotik hüceyrələrdə mitoxondri ATP-ni yaratmaq üçün aerob oksidləşmədən istifadə edir. Bu multifunksional orqanoid geniş müxtəliflikdə kiçik molekulların biosntezi və metabolizmi, həmçinin tənzimlənən hüceyrə ölümü daxil olmaqla bir çox başqa fəaliyyətlərdə də əsas rol oynayır (bax Cədvəl 12-1).
- Mitoxondri iki fərqli membrana (daxili və xarici) və iki fərqli subkompartmentə (iki membran arasındakı membranlararası boşluq və daxili membranla əhatə olunmuş matrisa) malikdir (bax Şəkil 12-6). Aerob oksidləşmə mitoxondrinin matrisasında və daxili mitoxondrial membranda baş verir.
- Daxili mitoxondrial membran öz tərkib hissəsi, quruluşu və funksiyalarına görə üç fərqli domendən: hüdud membranı, krista və krista qovşaqlarından ibarət olan, fasiləsiz davam edən tək membrandır. Mməməlilərin mitoxondrisi ilə ən azı 1100 zülal assosasiyadadır, bunların çoxu nüvə genləri ilə kodlaşdırılır. Zülalların mitoxondriyə daxil olduğu mexanizm Fəsil 13-də müzakirə edilir.
- Böyük ehtimalla mitoxondrilər və xloroplastlar eukaryotik nüvəyə malik olan əcdad hüceyrə ilə simbioz əlaqə yaradan bakteriyalardan törəmişlər (bax Şəkil 12-7).
- Mitoxondri və xloroplastların daxilində olan orjinal genlərin çoxu ya onların funksiyası nüvə genomu ilə eyni olduğundan lazımsız hesab edilərək itirilmiş, ya da təkamül dövrü ərzində nüvə genomuna keçirilmiş, müxtəlif orqanizmlərin mitoxondrilərində fərqli genlər dəsti saxlanılmışdır.
- mtDNT-nin əksər hissəsi irsən spermada deyil yumurtada verildiyindən mtDNT-də mutasiya sitoplazmatik irsiliyin ana xətti formasını nümayiş etdirir. Buna oxşar olaraq, xloroplast DNT-si irsən yalnız ana valideyin tərəfindən keçirilir.
- Heyvanların mtDNT-ləri dairəvi molekullar olub, özlərinin ehtimal olunan bakterial mənşəyini əks etdirirlər. Ümumiyyətlə, bitki mtDNT-lər və xloroplast DNT-lər, daha çox kodlaşdırmayan rayonlara və təkrarlanan ardıcıllıqlara malik olduqlarına görə, digər eukaryotların mtDNT-sinə nisbətən uzundurlar.
- Mitoxondrial matrisada mitoxondrial DNT (mtDNT) və xloroplast DNT-lər rRNT-ləri və mitoxondrial və fotosintetik elektron nəqliyyatına və ATP sintezinə daxil olan bəzi zülalları kodlaşdırırlar. Məməlilərin mtDNT-si yalnız 13 zülalı kodlaşdırır. Heyvanların əksəriyyətinin mtDNT-ləri və xloroplasr DNT-ləri orqanoid mRNT-lərin translyasiyası üçün lazım olan tRNT-ləri də kodlaşdırırlar.
- Mitoxondrial ribosomlar quruluşuna və xloramfenikol (həssas) və tsikloheksimid (dözümlü) kimi dərmanlara olan həssaslığına görə bakterial ribosomlara bənzəyirlər.
- Heyvan və göbələk mtDNT-lərin genetik kodu bakterial və nüvə genomunun genetik kodundan az fərqlənir. Həmçinin, müxtəlif heyvan və göbələk nümayəndələri daxilində də fərqlənirlər (bax Cədvəl 12-12). Bitki mtDNT-ləri isə əksinə, standard genetik koddan istifadə edirlər.
- İnsanların bir sıra sinir-əzələ pozuntuları mitoxondrial mtDNT mutasiyasından yaranır. Xəstələr bir qayda olaraq öz hüceyrələrində təbii formalı və mutant mtDNT-lərə (heteroplzmaya) malik olurlar, mtDNT-nin mutant fraksiyası nə qədər çox olarsa mutant fenotip də bir o qədər sərt olacaq.
- Mitoxondrilər dinamik orqanoidlərdir, hüceyrənin vəziyyəti ilə tənzimlənən qovuşma və ayrılma reaksiyalarına məruz qalırlar. Çox hüceyrələrdə, mitoxondrilər aralarında birləşmiş, böyük, şaxələnən boruvari şəbəkəni əmələ gətirirlər. GTP-azalar ailəsi mitoxondrial membran qovuşmasını və ayrılmasını həyata keçirirlər (bax Şəkil 12-12). Bu GTP-azaların bəzilərini kodlaşdıran genlərdə mutasiyalar insan xəstəliklərinin yaranmasına səbəb olur.
- Guman olunur ki, mitoxondrilərin ayrılması və qovuşması mitoxondrinin nisbi homogen populyasiyasının saxlanılmasına, hüceyrə bölünməsi zamanı mitoxondrilərin qız hüceyrələrə çatdırılmasına, qüsurlu mitoxondrinin sağlam mitoxondridən fərqləndirilməsinə imkan verən keyfiyyət nəzarəti systeminin təşkilində rol oynayır. Qüsurlu mitoxondrilər və ya mitoxondrinin fraqmentləri mitofaqiya adlanan proseslı dağıdılır.
- Mitofaqiyanı həyata keçirə bilən iki zülal, PINK1 və Parkin, mutasiya olunduqda erkən-yaranan Parkinson irsi xəstəliyinə səbəb olan genlərlə kodlaşdırılır.
- Mitoxondri-assosasiyalı membranlar (MAM) (bax Şəkil 12-13) endoplazmatik şəbəkənin zülal saplarla mitoxondriyə sıx bağlanan xüsusi rayonlarıdırlar.
- MAM/mitoxondri araüzü (interfeys) çox hüceyrə funksiyalarına, o cümlədən mitoxondrinin formasına və dinamikasına əhəmiyyətli dərəcədə təsir edir (bax Cədvəl 12-1).
- MAM/mitoxondri araüzü kalsiumun ER-dən mitoxondriyə daşınmasında əhəmiyyətli rol oynayır. Kalsiumun MAM-lardan mitoxondri daxilinə axması ATP sintezini stimullaşdıra bilir, mitoxondriyə kalsiumun həddən artıq daxil ollması isə tənzimlənən hüceyrə ölümü proqramını inisiasiya edir.

12.3 Limon Turşusu Tsikli və Yağ Turşusu Oksidləşməsi

Biz indi qlükozanın oksidləşməsi və ATP sintezi barədə ətraflı müzakirələrimizi qlikoliz zamanı (mərhələ I, bax Şəkil 12-1 və 12-3) yaranan və sonra mitoxondri matrisasına daşınan piruvatla nə baş vedriyini tədqiq etməklə davam edirik. Qlükozanın oksidləşməsinin (Şəkil 12-14) dörd mərhələsindən son üçü aşağıdakılardır:

● **Mərhələ II**. Mərhələ II, iki fərqli hissəyə ayrıla bilər: (1) piruvatın asetil CoA-ya çevrilməsi (2) asetil CoA-nın limon turşusu tsiklində CO_2 qədər oksidləşməsi. Bu oksidləşmə NAD^+-ın NADH-a və FAD-ın $FADH_2$-ə reduksiyası ilə birləşir. Bu iki daşıyıcı yüksək-enerjili elektronların mənbəyi hesab edilə bilər. (Yağ turşusunun oksidləşməsi də, yağ asil CoA-nın asetil CoA çevrilməsi ilə oxşar yolla gedir.) Reaksiyaların əksəriyyəti daxili membranın içərisində və ya səthində matrisaya baxan tərəfdə baş verir.

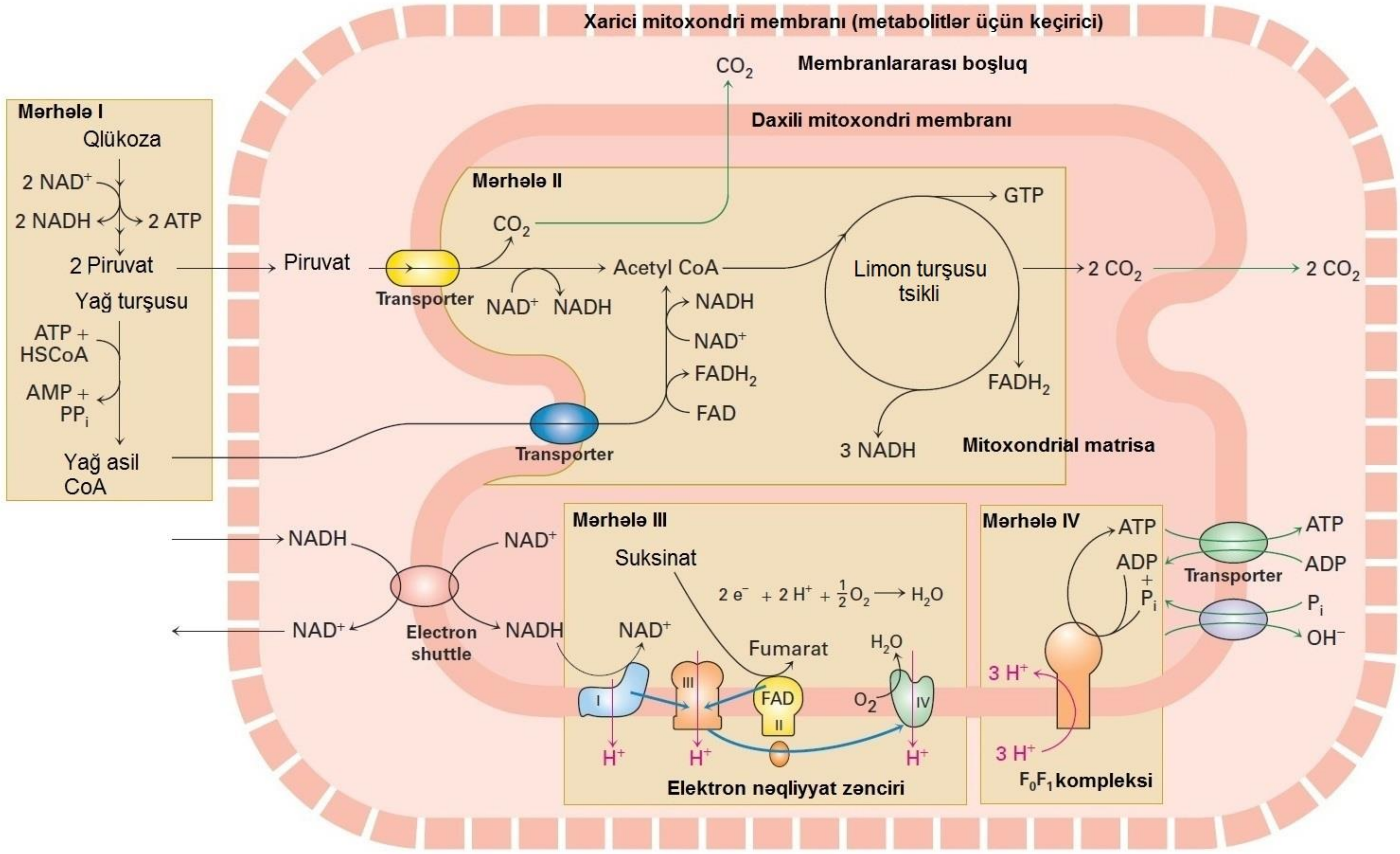
● **Mərhələ III**. Elektronların NADH və $FADH_2$-dən, daxili membran içərisindəki elektron-nəqliyyat zənciri vasitəsi ilə O_2-ə daşınması bu elektronlarda olan enerjini həmin membrandan

keçən, proton-hərəkətverici güvvə adlanan elektrokimyəvi qradientə çevirir.

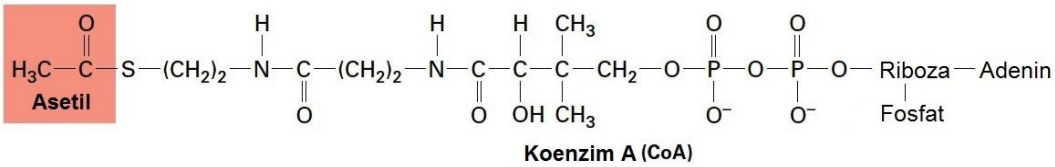
● **Mərhələ IV**. Daxili mitoxondrial membranda proton-hərəkətverici güvvənin enerjisi ATP sintezinə qoşulur. Mərhələ III və IV birlikdə oksidativ fosforlaşma adlanır.

II Mərhələnin Birinci Hissəsində Piruvat Asetil CoA və Yüksək-Enerjili Elektronlara Çevrilir

Mitoxondrial matrisa daxilində, piruvat koenzim A ilə reaksiyaya girir, CO_2, asetil CoA və NADH əmələ gətirir (Şəkil 12-14, mərhələ II, *solda*). *Piruvat dehidrogenaza* ilə kataliz olunan bu reaksiya yüksək dərəcədə ekzogendir ($\Delta G^{o\prime}$=–8.0 kkal/mol) və mahiyyətcə geriyə dönməyəndir. Kalsiumun MAM-dan mitoxondriyə axması asetil-CoA-nın əmələ gəlməsinə səbəb olan piruvat dehidrogenazanın fəallığını artırır.



ŞƏKIL 12-14 Qlükozanın və yağ turşularının aerob oksidləşməsinin ümumi şərhi. Mərhələ I: Sitozolda qlükoza piruvata (qlikoliz), yağ turşusu isə yağ asil CoA-ya çevrilir. Sonra piruvat və yağ asil CoA mitoxondriyə keçir. Mitoxondrial porinlər xarici membranı bu metabolitlər üçün keçirici edirlər, amma daxili membranda piruvatın (sarı) və yağ turşularının (mavi) matrisaya daşınması üçün xüsusi nəqliyyat zülalları (rənglənmiş oval) tələb olunurlar. Yağ asil qrupları yağ asil CoA-dan aralıq daşıyıcıya keçirilir, daxili membrandan keçərək daşınır və matrisa tərəfində yenidən CoA-ya birləşir. **Mərhələ II:** Mitoxondri matrisasında piruvat və yağ asil CoA asetil CoA-ya çevrilir, sonra CO_2 ayıraraq oksidləşir. Piruvat, NADH və CO_2 əmələ gəlməsi ilə asetil CoA-ya çevrilir; yağ asil CoA-dan iki karbon, $FADH_2$ və NADH-ın əmələ gəlməsi ilə asetil CoA-ya çevrilir. Limon turşusu tsiklində asetil CoA-ın oksidləşməsi NADH və $FADH_2$, GTP və CO_2 yaradır. **Mərhələ III:** Elektron nəqliyyatı O_2-i H_2O-ya qədər reduksiya edir və proton-hərəkətverici qüvvəni yaradır. Elektronlar (mavi) reduksiya olunmuş koenzimlərdən elektron-nəqliyyat kompleksi vasitəsi ilə H^+ ionlarının (qırmızı) matrisadan membranlararası sahəyə daşınmasını müşayət edən O_2-ə ötrülür və proton-hərəkətverici qüvvəni yaradır. NADH-dan elektronlar kompleks II-ni yan keçərək kompleks I-dən birbaşa kompleks III-ə axır. $FADH_2$-dən elektronlar kompleks I-i yan keçərək birbaşa kompleks II-dən kompleks III-ə axır. **Mərhələ IV:** Həmçinin F_0F_1 kompleks kimi də adlanan ATP sintaza (narıncı) elektron hərəkətverici qüvvəsini matrisada ATP sintezinə qoşur. Antiporter zülallar (bənöbşəyi və yaşıl oval) ADP ilə P_i-ı matrisaya daşıyır və hidroksil qrupu ilə ATP-ni eksport edir. Sitozolda yaranan NADH birbaşa matrisaya daşınmır, çünki daxili membran NAD^+ və NADH-a qeyri keçiricidir, əvəzində şatl sistem (qırmızı) elektronları sitozol NADH-ından matrisada NAD^+-a daşıyır. O_2 matrisaya, CO_2 isə matrisadan bayıra diffuziya edir.



ŞƏKİL 12-15 Asetil CoA-nın quruluşu. Bu birləşmə koenzim A (CoA) molekuluna kovalent birləşmiş asetil qrupundan təşkil olunmuşdur, piruvatın, yağ turşularının və çoxsaylı amin turşularının aerob oksidləşməsinin çox əhəmiyyətli intermediatıdır. O həmçinin bir çox biosintetik yollarda asetil qrupuna kömək edir.

Asetil CoA iki karbonlu asetil qrupunun koenzim A (CoA) adlanan uzun molekulla kovalent əlaqəsindən təşkil olunmuş molekuldur (Şəkil 12-15). O, piruvatın, yağ turşularının və amin turşularının oksidləşməsində mərkəzi rolu oynayır. Bundan başqa, o, çoxsaylı biosintetik reaksiyalarda, o cümlədən asetil qruplarının histon zülallarına və məməlilərin çoxsaylı zülallarına ötürülməsində və xolesterin kimi lipidlərin sintezində intermediatordur. Amma, tənəffüs edən mitoxondridə, asetil CoA-nın iki-karbonlu asetil qrupu demək olar ki, həmişə limon turçusu yolu ilə CO_2-də qədər oksidləşir. Qeyd edək ki, asetil qrupundakı iki karbon piruvatdan gəlir, piruvatın üçüncü karbonu karbon iki-oksid kimi buraxılır.

II Mərhələnin Ikinci Hissəsində Limon Turşusu Tsikli Asetil CoA-da Asetil Qrupunu CO_2 Qədər Oksidləşdirir və Yüksək-Enerjili Elektronları Yaradır

Tsikldə doqquz ardıcıl reaksiya asetil CoA-nın asetil qrupunu CO_2 qədər oksidləşdirmək üçün fəaliyyət göstərir (Şəkil 12-14, mərhələ II, *sağda*). Tsikl bir sıra adlandırmalarla tanınır: limon (sitrat) turşusu tsikli, üç karboksilli turşular tsikli (TCA) və Krebs tsikli. Tsiklin xalis nəticəsi ondan ibarətdir ki, tsiklə asetil CoA kimi daxil olan hər bir asetil qrupu üçün iki molekul CO_2, üç molekul NADH və $FADH_2$ ilə GTP-nin hərəsindən biri istehsal olunur. NADH və $FADH_2$ yüksək enerjili elektron daşıyıcılarıdır və mitoxondrial oksidləşmənin III mərhələsində əsas rolu – elektron nəqliyyatını yerinə yetirəcəkdir.

Şəkil 12-16-da göstərildiyi kimi, tsikl altı karbonlu limon turşusunu (*limon turşusu tsikli* də buradan götürülüb) əmələ gətirmək üçün asetil CoA-da iki karbonlu asetil qrupunun dörd karbonlu *oksalasetat* molekulu ilə kondensasiyası ilə başlayır. Pillə 4 və pillə 5 reaksiyaların hər birində CO_2 molekulu buraxılır və NAD^+ NADH-a reduksiya olunur. Bu reaksiyalarda CO_2 əmələ gətirmək üçün oksigen mənbəyi molekulyar oksigen (O_2) deyil, sudur (H_2O), pillə 4 və pillə 5-də gedən reaksiyaları kataliz edən fermentlərin fermentativ fəallığı MAM-dan mitoxondriyə axan kalsiumun hesabına yüksəlir. NAD^+-ın NADH-a reduksiya olunması pillə 9-dakı reaksiyada baş verir, beləliklə hər tsikl dövrəsində üç NADH yaranır. Pillə 7-dəki reaksiyada, iki elektron və iki proton FAD koenzimə köçürülməklə bu koenzimin reduksiya olunmuş forması, $FADH_2$ əmələ gəlir. Reaksiya pilləsi 7 ona görə fərqlidir ki, o limon turşusu tsiklinin (mərhələ II) yalnız daxili hissəsi deyil, həmçinin membrana birləşmiş fermentlə kataliz olunduğundan, bizim görəcəyimiz kimi, mərhələ III-də də çox əhəmiyyətli rol oynayır. Reaksiya pilləsi 6-da suksinil CoA-da yüksək-enerjili tioefir rabitəsinin hidrolizi substrat-səviyyəsində fosforlsşma vasitəsilə bir GTP-nin sintezi ilə birləşir. GTP və ATP bir-birinə çevrilə bildiyindən

$$GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP$$

bunu ATP-yaradan mərhələ hesab etmək olar. Reaksiya pilləsi 9 oksalasetatı regenerasiya edir, beləliklə tsikl yenidən başlaya bilir. Qeyd etmək lazımdır ki, molekulyar O_2 limon turşusu tsiklində iştirak etmir.

Limon turşusu tsiklinə daxil olan əksər fermentlər və kiçik molekullar mitoxondrial matrisanın su mühitində həll olmuşlar. Bunlara CoA, asetil CoA, suksinil CoA, NAD^+ və NADH və həmçinin limon turşusu tsiklinin əksər fermentləri daxildirlər. Amma, s*uksinat dehidrogenaza* (reaksiya pilləsi 7) daxili membrandakı inteqral membran zülalının fəal mərkəzi matrisaya baxan komponentidir. Mitoxondrilər zəif ultrasəs vibrasiyası ilə və ya osmotik lizislə dağıdılanda limon turşusu tsiklində membrana-birləşməyən fermentlər çox böyük multizülal komplekslər kimi ayrılırlar. Guman edilir ki, belə komplekslər daxilində bir fermentin reaksiya məhsulu məhlulda heç bir diffuziya etmədən birbaşa digər fermentə keçə bilir (bax Şəkil 3-30).

Bir molekul qlükozanın qlikolizi iki piruvat və iki asetil CoA molekullarını yaratdığından qlikolitiok yolda və limon turşusu tsiklində reaksiyalar hər qlükoza molekuluna altı CO_2 molekulunu, 10 NADH molekulunu və iki $FADH_2$ molekullarını istehsal edir (Çədvəl 12-3). Baxmayaraq ki, bu reaksiyalar iki ATP və iki GTP molekulları formasında dörd yüksək-enerjili fosfoanhidrid rabitələrini də yaradır, bunlar, bir qlükoza molekulunun tam aerob oksidləşməsindən ayrılan enerjinin yalnız kiçik bir fraksiyasını təmsil edirlər. Qalan enerj reduksiya olunmuş NADH və $FADH_2$ koenzimlərdə yüksək-enerjili elektronlar şəkilində saxlanılır, bunlar da "elektron daşıyıcıları" hesab edilə bilirlər. III və IV mərhələlərin məqsədi bu enerjini ATP formasında bərpa etməkdir.

Daxili Mitoxondrial Membranda Daşıyıcılar Sitozol və Matrisada Müvafiq NAD^+ və NADH Qatılığının Saxlanılmasına Kömək Edirlər

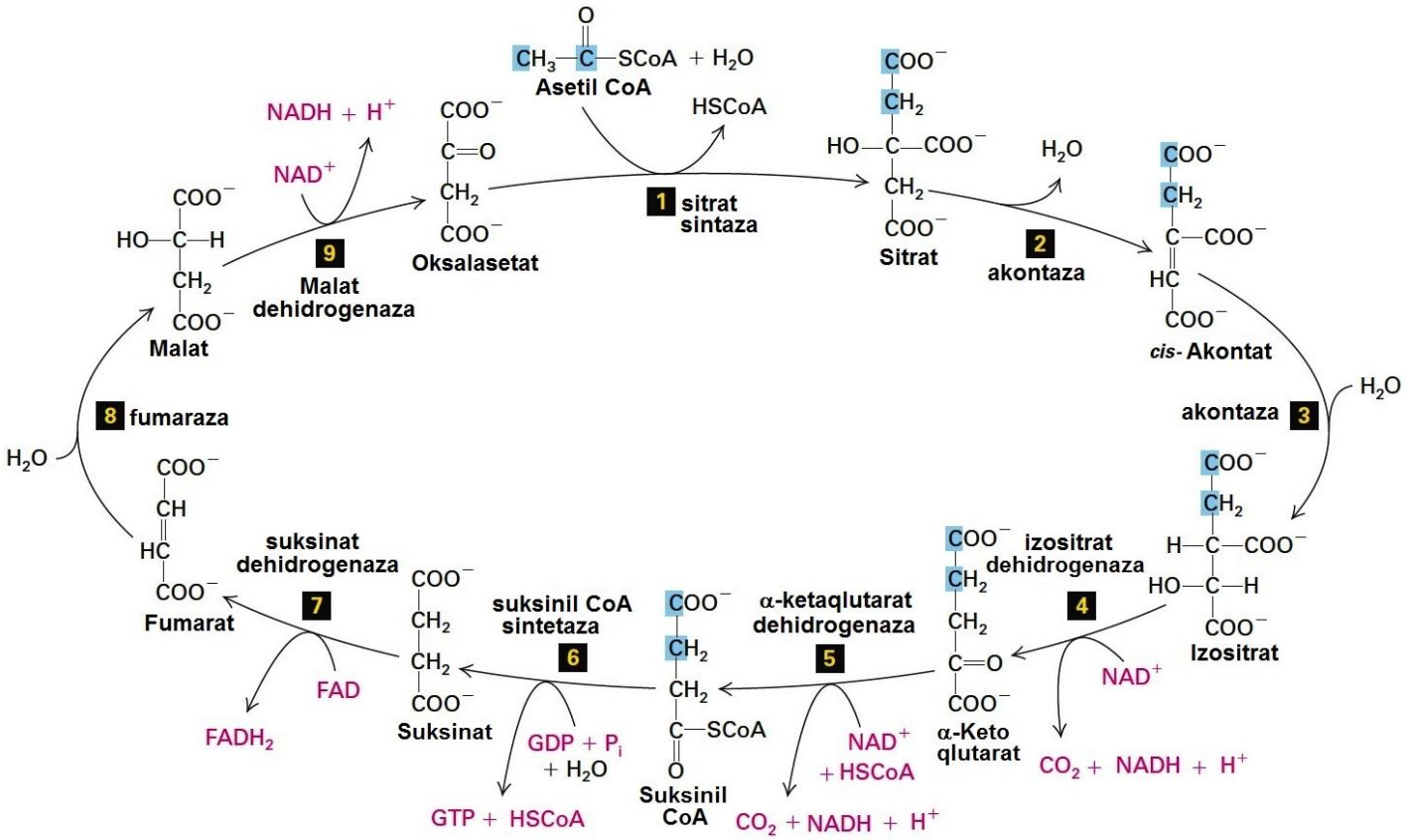
Sitozolda NAD^+ qlikolizdə pillə 6 üçün tələb lunur (bax Şəkil 12-3), mitoxondrial matrisada isə NAD^+ piruvatın asetil CoA-ya çevrilməsi üçün və limon turşusu tsiklində üç mərhələ üçün (Şəkil 12-16-da 4, 5, və 9) lazımdır. Bütün hallarda, NADH reaksiya məhsuludur. Əgər qlikoliz və piruvatın oksidləşməsi davam edərsə, NAD^+ substratın əldəolunan vəziyyətini təmin etmək üçün NADH-ın oksidləşməsi ilə NAD^+ regenerasiya olunmalıdır. (Buna oxşar olaraq, əgər FAD-dan-asılı reaksiya davam edərsə, II mərhələ reaksiyalarında yaranan $FADH_2$

oksidləşərək FAD əmələ gətirməlidir.) Növbəti bölmədə bizim görəcəyimiz kimi, daxili mitoxondrial membran *içərisində* elektron-nəqliyyat zənciri NADH-ı NAD^+-a və $FADH_2$-ni FAD-a çevirir, O_2-ni suya reduksiya etməklə bu molekulların reduksiya olunmuş formalarında yüksək-enerjili elektronlarda saxlanılan enerjini proton-hərəkətverici qüvvəsinə çevirir (mərhələ III). Hətta baxmayaraq ki, O_2 limon turşusu tsiklinin heç bir reaksiyasına girmir, amma O_2 olmadan, NADH və $FADH_2$-ni oksidləşdirmək üçün elektyron nəqliyyat zəncirinin mümkün olmaması üzündən NAD^+ və FAD-ın mitoxondridaxili ehtiyatı sərf olunub qurtardıqdan sonra bu tsikl fəaliyyətini tez bir zamanda dayandırardı. Bu müşahidələr belə bir sualın yaranmasına səbəb oldu ki, NAD^+ sitozolda necə regenerasiya olunur.

Əgər NADH sitozoldan mitoxondri matrisasına keçə və elektron nəqliyyqt zənciri ilə oksidləşə bilərsə və əgər NAD^+ məhsul geriyə sitozola daşına bilərsə, O_2 əldə ediləbilən olduqda sitozolda NAD^+-ın regenerasiuyası sadə olardı. Amma, daxili mitoxondrial membran NADH üçün keçirici deyil. Bu problemdən yan keçmək üçün və sitozol NADH-dan elektronların mitoxondrial elektron-nəqliyyat zənciri vasitəsi ilə *dolayı yolla* O_2-ə keçirilməsinə imkan yaratmaq üçün hüceyrələr elektronların sitozol NADH-dən matrisadakı NAD^+ keçirmək üçün bir sıra *elektron şatllardan* istifadə edirlər. Ən geniş yayılmış şatl olan – *malat-aspartat şatılın* fəaliyyəti (əməliyyatı) Şəkil 12-17-də təsvir edilmişdir.

Tsiklin hər bir tamamlanmış dövrəsində NADH və NAD^+ molekullarının və ya şatl tərəfindən istifadə olunan aralıq məhsullar aspartat və malatın sayında ümumi bir dəyişiklik olmur. Amma sitozolda, NADH NAD^+-a oksidləşir, bu da qlikolizdə istifadə oluna bilir, matrisada isə NAD^+ NADH-a reduksiya olunur, bu isə elektron nəqliyyatında istifadə oluna bilər:

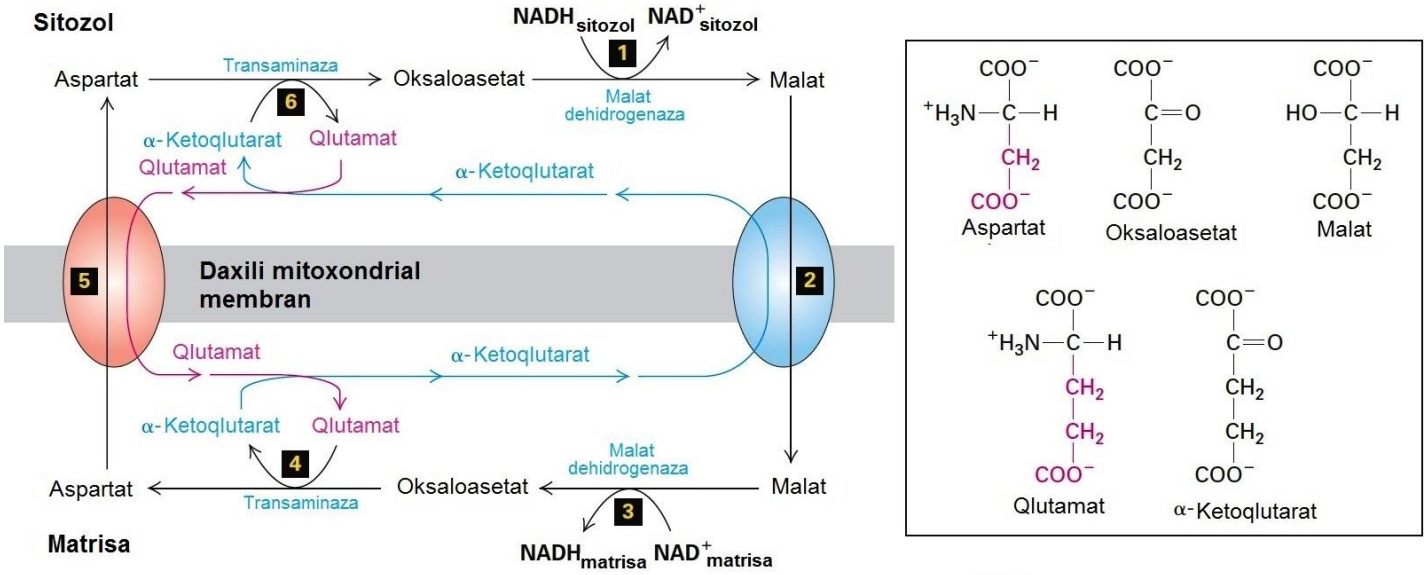
$$NADH_{sitozol} + NAD^+_{matrisa} \rightarrow NAD^+_{sitozol} + NADH_{matrisa}$$



ŞƏKİL 12-16 Limon turşusu tsikli. Asrtil CoA parçalanaraq CO_2 və yüksək enerjili elektron daşıyıcıları NADH və $FADH_2$ əmələ gətirirlər. Reaksiya 1-də Asetil CoA-dan iki-karbonlu asetil qalığı dörd-karbonlu oksaloasetatla kondensasiya olunur və altı-karbonlu limon turşusunu əmələ gətirir. Qalan reaksiyalarda (2-9), prosesin gedişində hər bir molekul limon turşusu iki CO_2 itirərək sonda geriyə oksaloasetata çevrilir. Tsiklin hər bir dövrəsində, dörd cüt elektron karbon atomlarından çıxarılır, üç molekul NADH, bir molekul $FADH_2$ və bir molekul GTP əmələ gəlir. Tsiklə asetil CoA ilə daxil olan iki karbon atomu suksinil CoA qədər mavi rənglə işarələniblər. Simmetrik molekullar olan suksinatda və fumaratda onlar artıq işarələnə bilmirlər. İzotopla işarələnmə ilə aparılan tədqiqatlar göstərdilər ki, bu karbon atomları daxil olduqları tsiklin dövrəsində itirilmirlər; orta hesabla, tsiklin növbəti dövrəsində biri CO_2 kimi itiriləcək, digəri isə sonra gələn növbəti dövrədə itiriləcək.

Cədvəl 12-3 Qlikolitik yolun və Limon turşusu tsiklinin xalis nəticəsi.

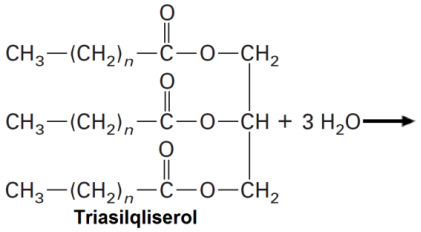
Reaksiyalar	CO_2 molekulları istehsal olunur	NAD^+ molekulları NADH-a reduksiya olunur	FAD molekulları $FADH_2$-yə reduksiya olunur	ATP və ya GTP
1 qlükoza iki piruvat molekuluna	0	2	0	2
2 piruvat 2 asetil CoA molekullarına	2	2	0	0
2 asetil CoA 4 CO_2 molekuluna	4	6	2	2
Cəmi	6	10	2	4

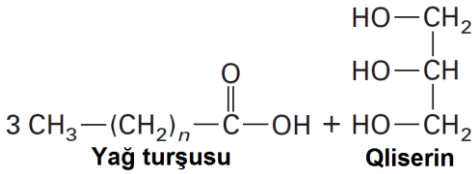


ŞƏKİL 12-17 Malat-aspartat şatlı. Reaksiyaların tsiklik seriyası sitozolda (membranlararası sahədə) NADH-dan elektronları NADH-a qeyri-keçirici olan daxili mitoxondrial membrandan keçərək matrisada NAD^+ ötürür. Son nəticə sitozoldakı NADH-ın NAD^+-la və matrisadakı NAD^+-ın NADH ilə əvəz olunmasından ibarətdir. Pillə 1: Sitozol malat dehidrogenazası elektronları sitozol NADH-dan oksalasetata keçirərək malatı əmələ gətirir. Pillə 2: Daxili mitoxondri membranında antiporter (mavi oval) α ketoqlutaratla mübadilədə malatı matrisaya daşıyır. Pillə 3: Mitoxondrial malat dehidrogenaza malatı yenidən oksalasetata çevirərək matrisada NAD^+-ı NADH-a reduksiya edir. Pillə 4: Daxili membranı birbaşa kəsib keçə bilməyən oksalasetat, qlutamatın amin qrupunu əlavə etməklə aspartata çevrilir. Matrisada transaminaza ilə kataliz olunan bu reaksiyada qlutamat α ketoqlutarata çevrilir. Pillə 5: İkinci antiporter (qırmızı oval) qlutamatla mübadilədə aspartatı sitozola eksport edir. Pillə 6: Sitozol transaminaza aspartatı oksalasetata və α ketoqlutaratı qlutamata çevirərək tsikli tamamlayır. Mavi oxlar, α ketoqlutaratın gedişini əks etdirir, qırmızı oxlar qlutamatın, qara oxlar isə aspartat/malat gedişini əks etdirir. Qeyd edilməlidir ki, aspartat və malat saat əqrəbi istiqamətində dövr edir, qlutamat və α ketoqlutarat isə əks istiqamətdə dovr edirlər.

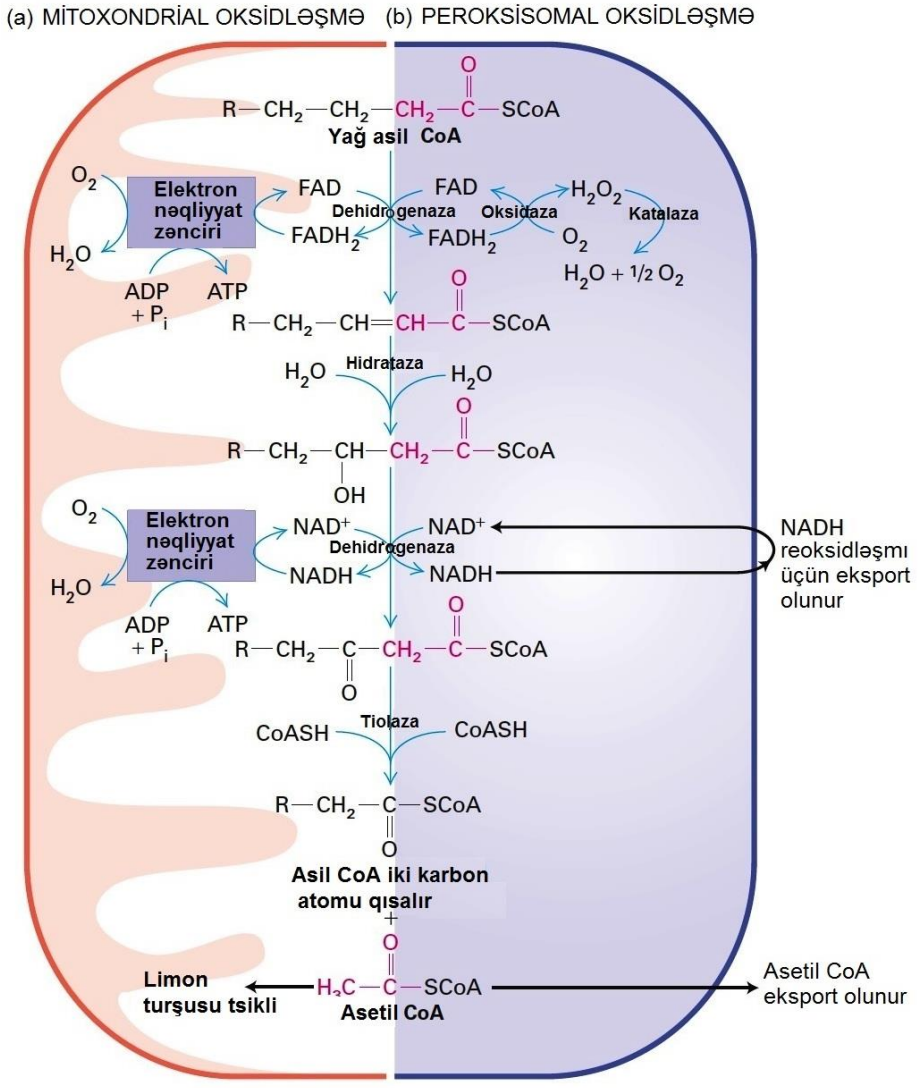
Yağ Turşularının Mitoxondrial Oksidləşməsi ATP Yaradır

Bu vaxta qədər biz diqqətimizi əsasən karbohidratların oksidləşməsinə, məhz ATP yaratmaq üçün qlükozanın oksidləşməsinə yönəltmişdik. Yağ turşuları hüceyrənin digər əhəmiyyətli enerji mənbəyidir. Hüceyrələr istər qlukozanı, istərsə də yağ turşularını hüceyrəxarici sahədən xüsusi nəqliyyat zülallarının köməyi ilə götürə bilirlər (Fəsil 11). Əgər hüceyrəyə bu molekulları dərhal yandırmaq lazım deyilsə o, bunları qlükozanın qlikogen adlanan polimeri kimi (xüsusən qara ciyər və əzələlərdə) və ya yağ turşularının qliserinə kovalent birləşmiş **triasilqliserol** və ya **triqliseridlər** adlanan trimerləri kimi ehtiyat saxlayır (aşağıda bax). Bəzi hüceyrələrdə qlükozanın artıq olan hissəsi ehtiyat saxlamaq üçün qliserinə kovalent birləşmiş yağ turşularına sonra isə triqliseridlərə çevrilir. Amma, mikroorqanizmlərdən fərqli olaraq, heyvanlar yağ turşularını qlükozaya çevirə bilmirlər. Hüceyrəyə ATP yaratmaq üçün bu ehtiyat enerjini yandırmaq lazım gələndə (məsələn, istirahətdə olan əzələlər işləməyə başlayanda və qlükozanı və ya yağ turşusunu yanacaq kimi yandıranda) fermentlər qlikogeni və ya yağ turşularını parçalayırlar və ya triasilqliserolu yağ turşularına hidroliz edirlər, sonra da onları ATP yaratmaq üçün oksidləşdirirlər:



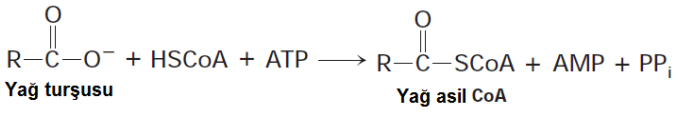


Yağ turşuları bəzi toxumalarda, xüsusən də yaşlıların urək əzələlərində əsas enerji mənbəyidir. Faktiki olaraq, insanlarda qlükozanın oksidləşməsidən daha çox piylərin oksidləşməsindən ATP yaranır. 1 qram triasilqliseridin CO_2-ə qədər oksidləşməsi 1 qram hidratasiya olunmuş qlikogenin oksidləşməsindən altı dəfə çox ATP yaradır. Beləliklə triaqliseridlər ehtiyat enerjinin saxlanılması üçün karbohidratlara nisbətən daha səmərəlidir, müəyyən mənada qismən ona görə ki, onlar anhidrat formasında saxlanılır və oksidləşdikdə daha çox enerji verə bilərlər, qismən də ona görə ki, onlar karbohidratlara nisbətən daxilən daha çox reduksiya olunmuşlar (daha çox hidrogenə malikdirlər). Məməlilərdə, triasilqliseridlərin toplanması üçün əsas mərkəz piy (adipoz) toxumasıdır, halbuki qlikogenin əsas toplanma mərkəzləri qaraciyər və əzələlərdir. Məməlilərdə, toxumaya daha çox ATP istehsal etmək lazım gələndə, piy toxumalarına triasilqliseridləri hidroliz etmək və yağ turşularınnı dövredici sistemə buraxmaq haqqında siqnal göndərilir ki, bu yolla onlar ATP tələb olunan toxumalara daşına bilsin.



ŞƏKIL 12-18 Yağ turşularının mitoxondri və peroksisomlarda oksidləşməsi. Həm mirtoxondrial oksidləşmədə (a), həm də peroksisomal oksidləşmədə (b) yağ turşuları fermentlə-kataliz olunan dörd reaksiyalar sırası ilə asetil CoA-ya çevrilir (şəkilin ortası ilə aşağıya doğru göstərilir). Yağ asil CoA molekulu asetil CoA-ya və iki karbon atomu qısalmış yağ asil CoA-ya çevrilir. Bununla eyni zamanda bir FAD molekulu $FADH_2$-ə reduksiya olunur və bir NAD^+ molekulu NADH-a reduksiya olunur. Bu tsikl qısalmış asil CoA üzərində yağ turşusu cüt sayda karbon atomları ilə tamamilə asetil CoA-ya çevrilənə qədər təkrar olunur. Mitoxondrilərdə, elektronlar $FADH_2$-dən və NADH-dan elektron nəqliyyat zəncirinə qoşulur və sonda ATP sintezində istifadə olunurlar; yaranan asetil CoA limon turşusu tsiklində oksidləşir, son nəticə CO_2 ayrılması və ATP-nin sintezi ilə nəticələnir. Peroksisomlar elektron nəqliyyatını həyata keçirmək üçün elektron nəqliyyat zənciri kompleksinə və limon turşusu tsiklinin fermentlərinə malik olmadığından bu orqanoiddə yağ turşularının oksidləşməsi ATP əmələ gətirmir.

Qlükozanın oksidləşməsində dörd mərhələ olduğu kimi yağ turşularının da oksidləşməsində dörd mərhələ vardır. ATP yaradılmasının səmərəliliyini optimallaşdırmaq üçün yağ turşusu oksidləşməsinin II mərhələsinin bir hissəsi (asetil CoA-nın limon turşusu tsiklində oksidləşməsi) və bütün III və IV mərhələləri qlükoza oksidləşməsinən mərhələləri ilə eynidir. Fərq sitozolda I mərhədə və mitoxondrial II mərhələnin birinci hissəsindədir. I mərhələdə sitozolda ATP-nin AMP və PPi (qeyri üzvi pirofosfata) hidrolizi ilə birlikdə gedən reaksiyada yağ turşusu yağ asil CoA-ya çevrilir (bax Şəkil 12-14):



Sonra pirofosfatın (PP_i) iki molekul P_i-a hidrolizindən enerji ayrılır, bu enerji reaksiyanın tamamlanmasını həyata keçirir. Yağ asil qruplarının mitoxondrial matrisaya keçirilməsi üçün onlar karnitin adlanan molekula kovalent qoşulur və asilkarnitin daşıyıcı (transporter) zülal vasitəsi ilə mitoxondrinin daxili membranından keçir (bax Şəkil 12-14, mavi oval), sonra matrisa tərəfində yağ asil qrupu karnitindən buraxılır və yenidən başqa CoA molekuluna qoşulur. Hüceyrələr adekvat enerji təchizatına (ATP) malik oarkən, yağ turşularının oksidləşməsinə mane olmaq üçün asilkarnitin daşıyıcının fəallığı tənzimlənir.

II mərhələnin birinci hissəsində mitoxondridə yağ asil CoA-nın hər molekulu dörd reaksiyanın tsiklik ardıcıllığı ilə oksidləşir, bütün karbon atomları hər dəfə ikisi olmaqla, $FADH_2$ və NADH yaradaraq asetil CoA çevrilir (Şəkil 12-18a). Məsələn, 18 karbonlu stearin turçusunun, $CH_3(CH_2)_{16}COOH$ hər molekulunun mitoxondridə oksidləşməsindən doqquz molekul asetil CoA və NADH ilə $FADH_2$-nin hər birindən səkgiz molekul alınır. II mərhələnin ikinci hissəsində, bu asetil qrupları piruvatdan yaranan asetil CoA-da olduğu kimi, limon turşusu tsiklinə girərək CO_2-a qədər oksidləşirlər. Növbəti bölmədə ətraflı təsvir edəcəyimiz kimi, reduksiya olunmuş NADH və $FADH_2$ öz yüksək-enerjili elektronları ilə proton-hərəkətverici qüvvəni yaratmaq üçün III mərhəldə istifadə olunacaqlar, yaranan proton-hərəkətverici qüvvə isə öz növbəsində IV mərhələdə ATP sintezinin enerji ilə təmin olunmasında istifadə olunur.

Yağ Turşularının Peroksisomlarda Oksidləşməsi ATP Yaratmır

Yağ turşularının mitoxondrial oksidləşməsi məməlilərin qaraciyər hüceyrələrində əsas ATP mənbəyidir və bir zamanlar biokimyaçılar inanırdılar ki, bu bütün hüceyrə tiplərində belədir. Lipid metabolizminin çox xüsusiyyətlərinə təsir edən dərman klofibrat ilə işlənilmiş siçovul yağ turşularının oksidləşməsinin artmasını və qaraciyər hüceyrələrində peroksisomların sayının yüksək dərəcədə artmasını nümayiş etdirmişdir. Bu kəşf göstərir ki, peroksisomlar, eləcə də mitoxondrilər yağ turşularını oksidləşdirə bilirlər. 0.2-1.0 μm diametrdə olan bu kiçik orqanoidlər, tək membranla örtülüdürlər (bax Şəkil 9-32). Onlar məməlilərdə eritrositlərdən başqa bütün hüceyrələrdə mövcuddurlar, həmçinin bitki hüceyrələrində, maya hüceyrələrində və demək olarki başqa eukaryot hüceyrələrin əksəriyyətində də tapılmışlar.

Mitoxondrilər daha böyük üstünlüklə qısa-zəncirləri [8 karbondan az olan yağ asil zəncirlərini, (<8)], orta-zəncirləri (C_8-C_{12}) və uzun zəncirləri (C_{14}-C_{20}) oksidləşdirirlər, amma peroksisomlar daha böyük üstünlüklə, mitoxondridə oksidləşə bilməyən, daha uzun-zəncirli yağ turşularını (VLCFAs>C_{20}) oksidləşdirirtlər. Qidada olan yağ turşularının əksəriyyəti uzun zəncirə malikdir, bu göstərir ki, onlar əsasən mitoxondridə oksidləşirlər. Yağ turşularının ATP yaranması ilə gedən mitoxondrial oksidləşməsindən fərqli olarq yağ turşularının peroksisomal oksidləşməsi ATP yaranması ilə əlaqəli deyil və yaranan enerji istilik şəkilində buraxılır.

Yağ turşularının asetil CoA-ya parçalandığı peroksisomlarda gedən reaksiya yolu mitoxondridəki eyni yola oxşardır (Şəkil 12-18b). Amma, peroksisomlar elektron nəqliyyat zəncirinə malik deyillər və yağ turşusunuin oksidləşməsi zamanı yaranan $FADH_2$-dən elektronlar *oksidazalar* vasitəsi ilə dərhal O_2-yə ötürülərək FAD-ı regenrasiya edir və hidrogen peroksidi (H_2O_2) yaradır. Peroksisomlar oksidazalardan başqa, çoxlu miqdarda *katalaza*lara da malikdirlər, bunlar yüksək sitotoksik H_2O_2-i dərhal dağıdırlar. Yağ turşusunun oksidləşməsi zamanı yaranan NADH sitozola eksport olunaraq orada yenidən oksidləşir, burada malat-aspartat şatılına ehtiyac yoxdur. Peroksisomlar həmçinin limon turşusu tsiklinə malik deyillər, ona görədə yağ turşularının peroksisomal oksidləşməsi zamanı yaranan asetil CoA daha sonra oksidləşə bilmir, əksinə onlar sitozola daşınaraq xolesterinin (Fəsil 7) və başqa metabolitlərin sintezində istifadə olunurlar.

12.3 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Limon Turşusu Tsikli və Yağ Turşusu Oksidləşməsi

- Qlükozanın oksidləşməsinin II mərhələsində, üç karbonlu piruvat molekulu əvvəlcə oksidləşərək CO_2, NADH və asetil CoA molekullarının hərəsindən birini əmələ gətirir. Sonra, asetil CoA limon turşusu tsiklində CO_2 qədər oksidləşir (bax Şəkil 12-14).
- Limon turşusu tsiklinin hər bir dövrəsi iki molekul CO_2 buraxır, üç molekul NADH, bir molekul $FADH_2$ və bir molekul GTP-ni yaradır (bax Şəkil 12-16).
- Qlükoza oksidləşməsinin I və II mərhələlərində ayrılan enerjinin əksər hissəsi müvəqqəti olaraq reduksiya olunmuş, yüksək-enerjili elektronları daşıyan və sonra elektron-nəqliyyat zəncirini (mərhələ III) idarə edən HADH və $FADH_2$ koenzimlərdə saxlanılır.
- Nə qlikoliz nə da limon turşusu tsikli birbaşa molekulyar oksigendən (O_2) istifadə etmir.
- Malat-aspartat şatl sitozolda qlikolizin fasiləsiz davam etməsi üçün lazım olan NAD^+ təchizatını regenerasiya edir (bax Şəkil 12-17).
- Qlükozanın oksidləşməsi kimi, yağ turşularının da oksidləşməsi dörd mərhələdə baş verir. I mərhələdə, yağ turşuları sitozolda yağ asil CoA-ya çevrilir. II mərhələdə, yağ asil CoA əvvəlcə NADH və $FADH_2$ yaranması ilə çoxsaylı asetil CoA molekullarına çevrilir. Sonra, qlükozanın oksidləşməsində olduğu kim, asetil CoA limon turşusu tsiklinə girir. III və IV mərhələlər yağ turşusuynun

və qlükozanın oksidləşməsi üçün eynidirlər (identikdirlər) (bax Şəkil 12-4).

- Eukaryot hüceyrələrin əksəriyyətində, qısa-zəncirdən uzun-zəncirə qədər yağ turşularının oksidləşməsi ATP istehsalı ilə birlikdə mitoxondridə baş verdiyi halda, çox uzun-zəncirli yağ turşularının oksidləşməsi əsasən peroksisomlarda baş verir və ATP istehsalı ilə bağlı olmur (basx Şəkil 12-18); yağ turşularının peroksisomal oksidləşməsi zamanı ayrılan enerji istiliyə çevrilir.

12.4 Elektron-nəqliyyat Zənciri və Proton-Hərəkətverici Qüvvənin Yaranması

Qlükozanın və yağ turşularının CO_2-ə qədər oksidləşməsindən (I və II mərhələlər) ayrılan enerjinin əksər hissəsi reduksiya olunmuş NADH və $FADH_2$-də yüksək-enerjili elektronlara çevrilir. Biz indi III mərhələyə qayıdırıq, bu mərhələdə reduksiya olunmuş koenzimlərdə müvəqqəti saxlanılan enerji, həmçinin **tənəffüs zənciri** kimi tanınan elektron nəqliyyat zəmciri ilə proton-hərəkətverici qüvvəsinə çevrilir. Biz əvvəlcə elektron nəqliyyat zəmcirinin məntiqini və komponentlərini təsvir edirik. Sonra, elektronlar zəncirdə hərəkət etdikcə biz onu və mitoxondrinin daxili membranında protonun nasosla vurulması mexanizmini izləyirik. Biz bu bölməni, elektron nəqliyyatı ilə və proton vurulması ilə yaranan proton-hərəkətverici qüvvənin miqyasının müzakirəsi ilə tamamlayırıq. 12.5 bölməsində proton-hərəkətverici qüvvənin ATP sintezində necə istifadə olunduğunu görəcəyik.

NADH və $FADH_2$-nin Oksidləşməsi Əhəmiyyətli Miqdarda Enerji Buraxır

Elektron nəqliyyatı zamanı, elektronlar NADH və $FADH_2$-dən buraxılır və sonda O_2-ə ötürülərək aşağıdakı ümumi reaksiyada göstərildiyi kimi suyu əmələ gətirir:

$$NADH + H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O,$$

$$\Delta G = -52.6 \text{ kkal/mol}$$

$$FADH_2 + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow FAD + H_2O,$$

$$\Delta G = -43.4 \text{ kkal/mol}$$

Xatırladaq ki, 1 qlükoza molekulunun qlikolitik yolla və limon turşusu tsikli ilə CO_2 çevrilməsi 10 NADH və 2 $FADH_2$ molekullarını yaradır (bax Cədvəl 12.3). Reduksiya olunmuş bu koenzimlərin oksidləşməsi –613 kkal/mol [10(–52.6) + 2(–43.4)] ümumi $\Delta G°'$ qiymətinə malikdir. Beləliklə, qlükozanın kimyəvi rabitələrində olan potensial sərbəst enerjinin (–686 kkal/mol) təxminən 90 faizi reduksiya olnmuş koenzimlərdə cəmlənir. Bu iki müxtəlif koenzim, NADH və $FADH_2$ nəyə görə lazımdır? Qlükozanın və yağ turşusunun oksidləşməsində olan reaksiyaların çoxu NAD^+ reduksiya etmək üçün kifayət qədər energetik olsalar da, bir neçəsi energetik deyil. Həmin reaksiyalar tərəfindən buraxılan enerjini tutmaq üçün bu reaksiyalar az enerji tələb edən FAD reduksiyası ilə birləşdirilir.

Reduksiya olunmuş koenzimlərdə daşınan enerji onları oksidləşdirməklə buraxıla bilər. Mitoxondri qarşısında duran belə bir biokimyəvi çağırış problemi bu oksidləşmə ilə buraxılan enerjinin imkan daxilində ATP-dəki terminal fosfoanhidrid rabitəsinə səmərəli ötürülməsidir.

$$P_i^{2-} + H^+ + ADP^{3-} \rightarrow ATP^{4-} + H_2O,$$

$$\Delta G = +7.3 \text{ kkal/mol}$$

Bir koenzim molekulunun reduksiyasının və bir ATP molekulunun sintezinin daxil olduğu, nisbətən sadə birindən-birinə reaksiya olduqca (dəhşətli dərəcədə) səmərəsiz olardı, çünki ADP və P_i-dan ATP yaranması üçün $\Delta G°'$ qiyməti koenzimin oksidləşməsinə nisbətən əhəmiyyətli dərəcədə azdır və enerjinin əsas hissəsi istilik şəkilində itməli idi. Enerjini səmərəli şəkildə bərpa etmək üçün mitoxondri koenzimlərin oksidləşməsindən alınan enerjini bir sıra elektron daşıyıcılarından istifadə edərək proton-hərəkətverici qüvvəsinə çevirir, bu daşıyıcıların biri istisna olmaqla hamısı daxili membranın inteqral komponentləridirlər (bax Şəkil 12-14). Proton-hərəkətverici qüvvə sonra çox səmərəli şəkildə ATP yaradılmasında istifadə oluna bilir.

Mitoxondridə Elektron Nəqliyyatı Proton Vurulması ilə Birləşir

Elektronların NADH və $FADH_2$-dən O_2-ə daşınması zamanı protonlar mitoxondrinin matrisasından daxili membranla vurulur. Bu vurulma mitoxondrial matrisanın pH-nı membranlararası sahəyə və sitozola nisbətən qaldırır və matrisanı membranlararası sahə ilə müqayisədə daha çox elektromənfi edir. Başqa sözlə, NADH və $FADH_2$-nin oksidləşməsi zamanı ayrılan sərbəst enerji membranda həm proton qatılılğı qradienti kimi həm də elektrik qradienti kimi saxlanılır – buna da ümumilikdə proton-hərəkətverici qüvvə deyilir (bax Şəkil 12-2). Bizim 12.5 bölməsində görəcəyimiz kimi, protonların bu qüvvə ilə idarə olunan, daxili membranla geriyə hərəkəti ATP sintaza vasitəsilə ADP və P_i-dan ATP-nin sintezi olunmasına birləşir (IV mərhələ).

Elektronların NADH və $FADH_2$-dən O_2-ə ötürülməsindən ayrılan enerji ilə aparılan, ATP-nin ADP və P_i-dan sintezi olunması qeyri-fotosintez edici aerob hüceyrələrdə ATP-nin əsas mənbəyidir. Çoxsaylı sübutlar göstərir ki, mitoxondri və bakteriyada bu *oksidadtiv fosforlaşma* prosesi mitoxondrilərin daxili membranlarında və ya bakteriyaların plazma membranında eyni zamanda baş verən proton-hərəkətverici qüvvənin yaranmasından, elektron nəqliyyatından, proton vurulmasından və ATP yaranmasından asılıdır. Məsələn, laboratoriyada ayırılmış intakt mitoxondriyə O_2-nin və piruvat və ya suksinat kimi oksidləşdirici substratın əlavə olunması sonda, əgər daxili membran intaktdırsa ATP sintezi ilə nəticələnir. Cüzi miqdarda detergentin mühitdə mövcud olması membranı sızdırıcı (deşik) edir, elektron nəqliyyatı və bu metabolitlərin O_2 ilə oksidləşməsi hələ də baş verir. Amma, bu şəraitdə ATP sintezi baş vermir, çünki proton sızması proton-hərəkətverici qüvvəsinin saxlanılmasına mane olur.

Elektronun NADH-dan (və ya $FADH_2$-dən) O_2-ə daşınması ilə daxili mitoxondrial membranda proton daşınması arasındakı çütləşməni eksperimental olaraq ayırılmış intakt mitoxondrilərlə nümayiş etdirmək olar (Şəkil 12-19). Mitoxondrinin O_2-siz, NADH-a malik olan suspenziyasına O_2 əlavə edilən kimi, mitoxondrinin xarici membranı protonları daha asanlıqla keçirdiyindən mitoxondrinin xaricində olan

mühitin turşuluğu keçici olaraq artır (proton qatılığı artır). (Yada salaq ki, malat-aspartat şatılı və başqa şatllar məhluldakı NADH-ı matrisadakı NADH-a çevirir.) Reduksiya olunmaqla O_2 sərf edilib qurtardıqdan sonra, mühütdə qalan artıq proton zəif şəkilldə geriyə matrisaya sızır. Belə eksperimentlərdə pH dəyişilmələrinin ölçülməsi ilə aparılan analizlərdən hesablamaq olar ki, hər bir elektron cütü NADH-dan O_2-ə keçirilərkən təxminən 10 proton matrisadan kənara daşınır.

$FADH_2$-nin sayını əldə etmək üçün yuxarıdakı eksperiment substrat kimi NADH əvəzinə suksinat istifadə etməklə təkrar edilə bilər. (Xatırladaq ki, limon turşusu tsiklində suksinatın fumarata oksidləşməsi $FADH_2$ yaradır; bax Şəkil 12-16). Əlavə olunan suksinatın miqdarı elə tənzimlənə bilər ki, əmələ gələn $FADH_2$-nin miqdarı birinci eksperimentdəki NADH-ın miqdarına ekvivalent olsun. Birinci eksperimentdə olduğu kimi, oksigenin əlavə edilməsi mitoxondrinin xaricindəki mühitin turş olmasına səbəb olur, amma bu NADH-la olduğundan az olur. Bu fərq təccübləndirici deyildir, çünki $FADH_2$-də elektronların malik olduğu potensial enerji (43.4 kkal/mol) NADH-da elektronların potensial enerjisinə nisbətən (52.6 kkal/mol) daha azdır, beləliklə o, matrisadan daha az protonuun translokasiyasını və daha az pH dəyişməsini həyata keçirir.

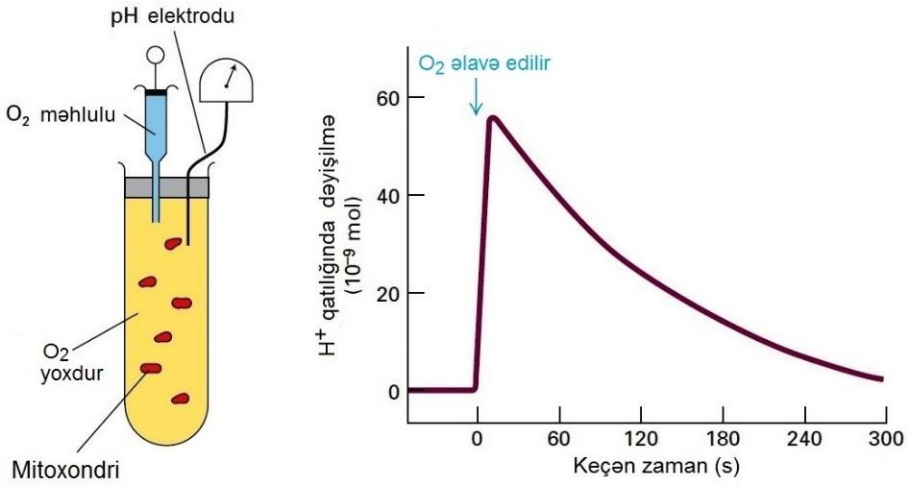
Elektronlar Elektron Daşıyıcıları Sırasından Keçərək "Aşağıya" Doğru Axır

İndi biz elektronların NADH və $FADH_2$-dən son elektron akseptoru O_2-ə energetik cəhətdən sərfəli hərəkətini daha yaxından öyrənək. Sadəlik üçün, biz öz müzakirəmizi NADH üzərində cəmləyəcəyik. Tənəffüs edən mitoxondridə, hər bir NADH molekulu iki elektronu elektron nəqliyyat zəncirinə buraxır; bu elektronlar nəticə etibarı ilə bir oksigen atomunu (O_2 molekulunun yarısını) reduksiya edərək bir molekul suyu əmələ gətirir:

$$NADH \rightarrow NAD^+ + H^+ + 2\ e^-$$

$$2\ e^- + 2\ H^+ + \tfrac{1}{2}\ O_2 \rightarrow H_2O$$

EKSPERIMENTAL ŞƏKIL 12-19
NADH-dan O_2-yə elektron ötürülməsi mitoxondrial membranda proton daşınması ilə cütləşir. Əgər NADH O_2-si tükənmiş mitoxondri suspenziyasına əlavə edilərsə, NADH oksidləşməyəcək. Sistemə kiçik miqdarda O_2 əlavə ediləndə (ox) mitoxondri xricində onu əhatə edən mühitdə protonun qatılığında kəskin artma (pH-ın enməsi) müşahidə olunur. Beləliklə, NADH-ın O_2 ilə oksidləşməsi protonların matrisadan xaricə getməsi ilə cütləşir. O_2 sərf olunub qurtardıqdan sonra, protonun artıq qalan hissəsi tədricən geriyə mitoxondriyə qayıdır (ATP sintezini gücləndirir) və hüceyrəxarici mühitin pH-ı öz ilkin qiymətinə qayıdır.



Cədvəl 12-4 Tənəffüs Zəncirində Elektron-Daşıyan Prostetik Qruplar.

Zülal komponentləri	Prostetik qruplar*
NADH-CoQ reduktaza **(kompleks I)**	*FMN* Fe-S
Siksinat-CoQ reduktaza **(kompleks II)**	FAD Fe-S
$CoQH_2$-sitoxrom *c* rediktaza **(kompleks III)**	Hem b_L Hem b_H Fe-S Hem c_1
Sitoxrom *c*	Hem *c*
Sitoxrom *c* oksidaza **(kompleks IV)**	Cu_a^{2+} Hem *a* Cu_b^{2+} Hem a_3

*Zülal kompleksinə həmişəlik birləşməmiş elektron daşıyıcısı Koenzim Q daxdil edilməmişdir.
MƏNBƏ: J.W. Pierre and L.Rnster, 1977, *Ann.Rev. Biochem* **46**:201.

Elektronlar NADH-dan O_2-yə hərəkət edərkən onların elelktrik potensialı 1.14 V azalır, bu isə ötürülən elektronların 26.2 kkal/mol-na və ya bir cüt elektron üçün təxminən 53 kkal/mol-a uyğun gəlir. Öncə qeyd olunduğu kimi, bu enerjinin əksər hissəsi daxili membran boyu yaranan proton-hərəkətverici qüvvəsində saxlanılır.

Dörd böyük çoxzülallı kompleks (I-IV komplekslər) daxili mitoxondrial membranda, proton-hərəkətvrici qüvvənin yaranmasında cavabdeh olan elektron nəqliyyat zəncirini təşkil edirlər (bax Şəkil 12-14, mərhələ III). Hər bir kompleks, birləşdirilmiş oksidləşmə-reduksiya reaksiyalarında elektronların donor molekulundan akseptor molekuluna keçməsi prosesində iştirak edən bir neçə *prostetik qruplara* malikdir (bax Fəsil 2). Bu kiçik qeyri-peptid üzvi molekullar və ya metal ionları sıx və spesifik şəkildə çoxzülallı komplekslərlə birləşmişlər (Cədvəl 12-4).

ŞƏKİL 12-20 Elektron-nəqliyyat zəncirində hem və dəmir-kükürd prostetik qruplar. (a) $CoQH_2$-sitoxrom *c* reduktazanın komponentləri (kompleks III) sitoxrom b_L və b_H-ın hem hissəsi. Eyni porfirin halqa (sarı) bütün hemlərdə mövcuddur. Porfirin halqayə birləşmiş kimyəvi əvəzedicilər elektron-nəqliyyat zəncirindəki başqa sitoxromlarda fərqlənir. Bütün hemlər bir dəfəyə bir elektronu qəbul edir və verir. (b) Dimer dəmir-kükürd klasteri (Fe-S). Hər bir Fe atomu dörd S kükrd atomuna birləşir: ikisi qeyri üzvi kükürdə və ikisi assosasiyada olan zülalların sistein qalıqlarının yan zəncirinə. Bütün Fe-S klasterləri bir dəfəyə bir elektronu qəbul edir və buraxır.

Hem və Sitoxromlar Bir neçə tip *hem*, hemoqlobində və mioqlobində tapılmış prostetik qrupa oxşar olan dəmir-saxlayan prostetik qruplar (Şəkil 12-14a), sıx şəkildə **sitoxromlar** adlanan mitoxondrial zülallar dəstinə birləşirlər. Hər bir sitoxrom, *a*, *b*, *c* və ya c_1 kimi hərflərlə təyin edilir. Sitoxromlarla elektronların axması hem molekulunun mərkəzində Fe atomlarının oksidləşməsi və reduksiyası ilə baş verir:

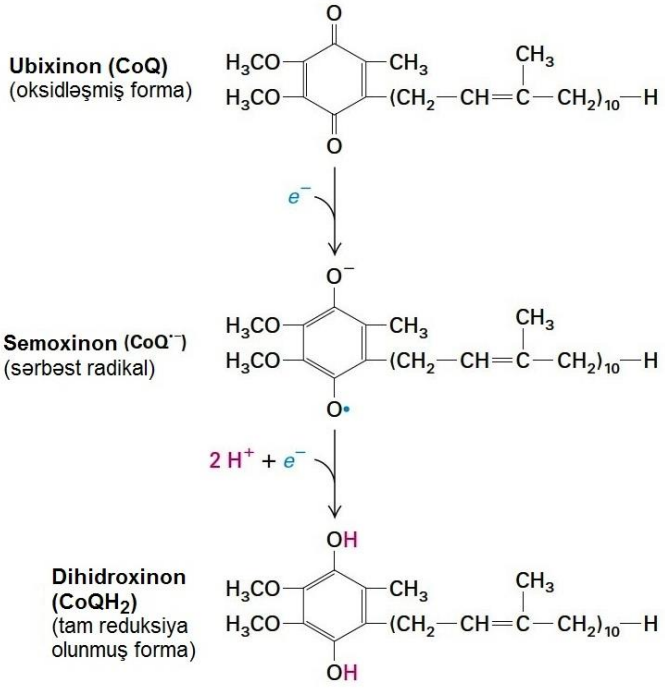
$$Fe^{3+} + e^- \rightleftharpoons Fe^{2+}$$

Sitoxromlarda hem halqası növbələşən bir-qat və iki-qat rabitələrlə birləşmiş atomlardan ibarət olduğundan, böyük sayda rezonans hibrid formaları mövcuddur. Bu imkan verir ki, sitoxroma gətirilmiş əlavə elektronlar hem karbonlarından və azot atomundan, eləcə də Fe ionlarından keçərək yayılsınlar.

Müxtəlif sitoxromlar az fərqlənən hem qruplarına və onları əhatə edən (aksial liqandlar adlanan) atomlara malikdirlər ki, bunlar da Fe ionları üçün müxtəlif mühitləri yaradırlar. Buna görə də, hər bir sitoxrom fərqli reduksiya potensialına və ya elektronları qəbul etmək tendensiyasına – zəncir boyu biristiqamətli "enən" elektrton axınını diktə edən çox əhəmiyyətli bir xassəyə malik olurlar. Suyun potensial enerji vəziyyətində yuxarıya deyil, məhz yuxarıdan aşağıya döğru spontan axdığı kimi, elektronlar da hemlərin elektron reduksiya potensialının fərqləriinə görə bir hemdən (və ya başqa prostetik qrupdan) digərinə yalnız bir istiqamətdə axa bilir. (Reduksiya potensialı *E* konsepsiyasına Fəsil 2-də daha geniş bax.) Sitoxrom *c* istisna olmaqla bütün başqa sitoxromlar daxili mitoxondrial membranda çoxzülalı inteqral membran kompleklslərinin komponentləridirlər.

Dəmir-Kükürd Klasterləri *Dəmir-kükürd klasterləri*, qeyrihem dəmirə malik olan prostetik qruplar olub, qeyri üzvi S atomları və zülaldakı sistein qalıqlarının S atomları ilə birləşən Fe atomlarından təşkil olunmuşlar (Şəkil 12-20b). Klasterdə bəzi Fe atomları +2 yükü daşıyırlar, başqaları isə +3 yükə malik olurlar. Amma, hər bir Fe atomunun xalis yükü əslində +2 və +3 arasındadır, çünki onların ən xarici orbitindəki elektronlar nəqliyyat zənciri ilə daşınan əlavə elektronlarla birlikdə Fe atomları arasında səpilir və sürətlə bir atondan digərinə keçirlər. Dəmir-kükürd klasterləri elektronları hər dəfəyə biri olmaqla qəbul edir və buraxır.

.



ŞƏKİL 12-21 Koenzim Q-in (CoQ) iki protonu və iki elektronu daşıya bilən oksidləşmiş və reduksiya olunmuş formaları. İzopren vahidində uzun karbohidrogen "quyruğun" olmasına görə ubixinon kimi də adlanan, CoQ fosfolipid ikiqatlısının hidrofob özəyində həll ola bilir və ona görə də çox hərəkətlidir (mobildir). CoQ-nün tam reduksiya olunmuş formaya, QH_2 (dihidroxinon) reduksiyası, semixinon adlanan yarı-reduksiya olunmuş sərbəst-radikal aralıq məhsulla birlikdə iki mərhələdə baş verir.

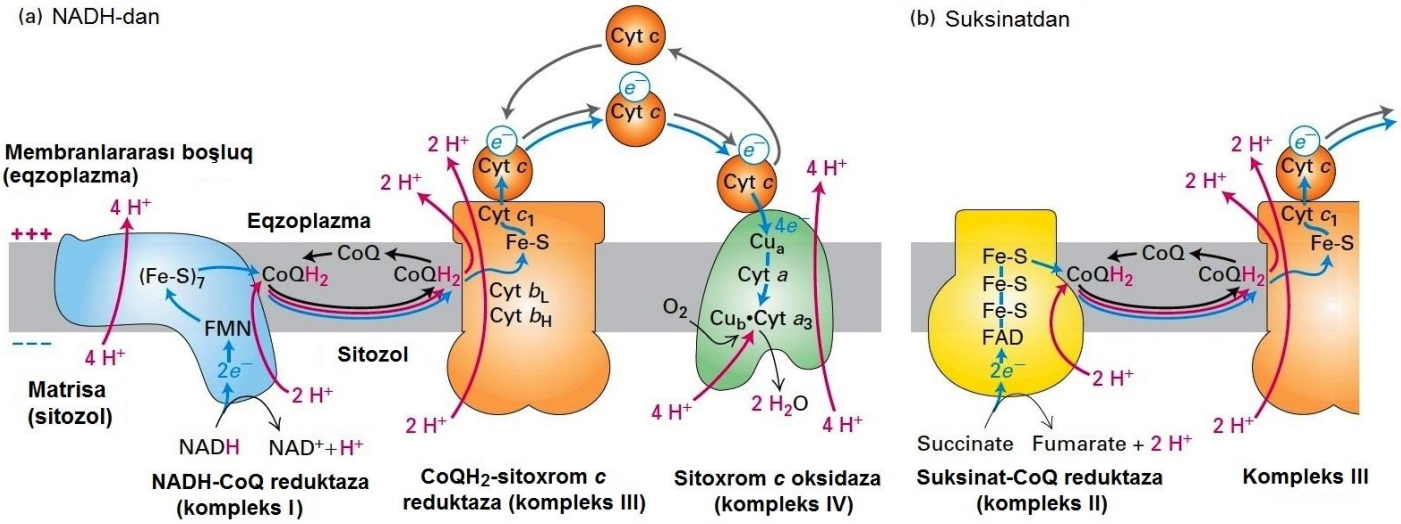
Koenzim Q Həmçinin *ubixinon* kimi adlanan *koenzim Q* (CoQ), mahiyyətcə geriyə dönən zülal birləşmiş prostetik qrupu olmayan elektron nəqliyyat zəncirində yeganə kiçik molekullu elektron daşıyıcısıdır (Şəkil 12-21). O həm elektronların həm da protonların daşıyıcısıdır. CoQ-nün oksidləşmiş xinon forması tək bir elektronu qəbul edib CoQ^{*-} kimi işarələnən yüklü sərbəst radikal semixinonu əmələ gətirə bilir. İkinci elektronun və iki protonun (beləliklə cəmisi iki hidrogen atomu) CoQ^{*-}-ə əlavə

olunması tam reduksiya olunmuş formanı, dihidroxinonu ($CoQH_2$) əmələ gətirir. Həm CoQ həm də $CoQH_2$ fosfolipidlərdə həll olurlar və daxili mitoxondrial membranın hidrofob mərkəzindən asanlıqla diffuziya edirlər. Bu xassələr ubixinonun elektron nəqliyyat zəncirində necə iştirak etməsinin: zəncirin membrana-batmış zülal kompleksləri arasında elektronları və protonları daşımasının əsasında durur.

İndi biz, bu prostetik qrupları istifadə edən multizülal komplekslərinə və bu kompleksləri keçərkən protonların və elektronların qət etdiyi yollara ətraflı başaxacğıq

Dörd Böyük Multizülal Kompleks Daxili Mitoxondrial Membranda Elektron Nəqliyyatını Protonların Vurulması İlə Birləşdirir

Elektron nəqliyyat zəncirində elektronlar bir elektron daşıyıcısından digərinə aşağıya doğru axanda buraxılan enerji, daxili mitoxondrial membranda protonların öz elektrokimyəvi qradientlərinə qarşı vurulmasını təmin etmək üçün istifadə olunur. Dörd böyük multuzülal kompleksi: *NADH-CoQ reduktaza* (kompleks I, >40 subvahid), *suksinat-CoQ reduktaza* (kompleks II, 4 subvahid), *$CoQH_2$–sitoxrom c reduktaza* (kompleks III, 11 subvahid) və *sitoxrom c oksidaza* (kompleks IV, 13 subvahid) birbaşa və ya dolayı yolla elektronların hərəkətini proton vurulması ilə bağlayırlar (Şəkil 12-22). Elektronlar kompleksdə iki yoldan biri ilə hərəkət edir: **I→III→IV** və ya **II→III→IV**. I, III və IV komplekslər protonları birbaşa daxili membrandan vururlar, amma kompleks II vurmur (bax Şəkil 12-22). NADH-dan elektronlar $CoQ/CoQH_2$ vasitəsi ilə kompleks I-dən kompleks II-ə axır, sonra həllolan zülal sitoxrom *c* (cyt *c*) vasitəsilə kompleks IV-ə axır, molekulyar oksigeni reduksiya edir (kompleks II-dən yan keçir) (bax Şəkil 12-22a), $FADH_2$-dən elektronlar $CoQ/CoQH_2$ vasitəsilə kompleks II-dən kompleks III-ə axır (bax Şəkil 12-22b), sonra isə sitoxrom *c* vasitəsilə kompleks IV-ə axır, molekuıyar oksigeni reduksiya edir (kompleks I-dən yan keçir).



ŞƏKİL 12-22 Mitoxondrial elektron nəqliyyat zənciri. Elektronlar (mavi oxlar) dörd əsas mültizülal kompleksdən (I-IV) axaraq keçir. Komplekslər arasında elektronların hərəkəti ya lipiddə-həll olan koenzim Q molekulları (CoQ, oksidləşmiş forma; $CoQH_2$ reduksiya olunmuş forma), ya da suda həll olan zülal sitoxrom *c* (cyt *c*) vasitəsi ilə həyata keçirilir. Çoxzülallı komplekslərdən üçü elektronlardan buraxılan enerjidən protonların matrisadan (bakteriyada sitozol kompartmenti) membranlararası boşluğa (bakteriyada eqzoplazmatik sahəyə) vurulması üçün (qırmızı oxlar) istifadə edirlər. (**a**) NADH-dan keçən yol. NADH-dan elektronlar (2/oksidləşmiş NADH) kompleks I-i keçərək, əvvəlcə flavin mononukleotid (FMN) vasitəsi ilə, sonra isə ardıcıl olaraq yeddi dəmir-kükürd (Fe-S) klasteri vasitəsi ilə CoQ-ə axır, bu zaman iki proton birləşərək $CoQH_2$ əmələ gətirir. Kompleks I-də elektronların axması ilə müşayət olunan konformasiya dəyişiklikləri protonun matrisadan membranlararası boşluğa vurulmasını (qırmızı oxlar) həyata keçirir. Sonra elektronlar azad olan (və yenidən dövrəyə qayıdan) $CoQH_2$ ilə III kompleksə və sonra da cyt *c* vasitəsilə kompleks IV-ə axır. İki NADH-dən meydana gələn dörd elektronu daşıyan dörd cyt *c* molekulunun hər biri, bir O_2 molekulunun iki H_2O molekuluna qədər dörd elektronu reduksiya olunması üçün və dörd protonun daşınması üçün fərdi elektronları kompleks IV-ə ötürür. Beləliklə hər oksidləşən iki NADH və reduksiya olunan bir H_2O molekulu üçün cəmisi 20 proton matrisadan kənara membranlararası boşluğa translokasiya olunur. (**b**) Suksinatdan keçən yol. Hər bir suksinatdan iki elektron FAD/$FADH_2$ və dəmir-kükürd klasterləri (Fe-S) vasitəsilə kompleksə II-ə, $CoQ/CoQH_2$ vasitəsilə kompleks II-dən kompleks III-ə və sonra da, cyt *c* vasitəsilə kompleksə IV-ə axır. Kompleks II-də suksinatın fumarata oksidləşməsi zamanı azad olan elektronlar əlavə protonlar translokasiya olunmadan CoQ-nün $CoQH_2$-ə reduksiya olunması üçün istifadə olunur. $CoQH_2$-dən elektron nəqliyyatının qalan hissəsi (a)-dakı NADH yolunda olduğu kimi eyni yolla gedir. Beləliklə, oksidləşmiş hər bir iki suksinat üçün və reduksiya olunmuş bir O_2 molekulu üçün 2 proton (8-i kompleks III-ün Q-tsikli vasitəsilə, 4-ü isə kompleks IV vasitəsilə) translokasiya olunur.

Şəkil 12-22-də göstərildiyi kimi, CoQ, NADH-CoQ reduktazadan (kompleks I) və ya suksinat-CoQ reduktazadan (kompleks II) ayrılan elektronları qəbul edir və onları $CoQH_2$–sitoxrom *c* reduktazaya (kompleks III) verir. Protonlar eyni zamanda, membranın matrisa tərəfindən (sitozol tərəf də adlandırılır) membranlararaasi boşluğa (eqzoplazmatik tərəf də

adlandırılır) daşınır. Hər dəfə CoQ elektronları qəbul etdikdə, o bunu zülal kompleksinin matrisa tərəfindəki birləşmə saytında edir, və həmişə mühitdən protonları orada toplayır. Hər dəfə $CoQH_2$ öz elektronlarını buraxanda, o bunu zülal kompleksinin membranlararası boşluq tərəfindəki saytdan edir, protonları membranlararası boşluğun maye mühitinə buraxır. Beləliklə, CoQ ilə hər cüt elektronun daşınması məcburi olaraq iki protonun matrisadan membranlararası boşluğa keçirilməsi ilə birləşir (bağlanır).

NADH-CoQ Rediktaza (Kompleks I) Elektronlar NADH-CoQ reduktaza vasitəsi ilə NADH-dan CoQ-ə keçirilir (bax Şəkil 12-22a). Bakteriyalardan (14 subvahid, kütləsi ~500 kDa) və eukaryotlardan (~1 Mda, bakteriyalarınkına oxşar olan 14 yüksək dərəcədə konservativ özək subvahid və 26-32 köməkçi – aksessor subvahidlər) alınan kompleks I-in elektron mikroskopiya və rentgen-kristalloqrafiya analizi aşkar etdi ki, o L-şəkillidir (Şəkil 12-23a). L-in membrana batmış qolu yüngülcə əyilmişdur, təxminən 180 Å uzunluqdadır və 60-dan çox transmembran α spirala malik olan zülallardan təşkil olunumuşdur. Bu qolun dörd subdomeni vardır, bunlardan üçü kation antiparterlər ailəsinin üzvlərində olan zülallara malikdirlər. Hidrofil periferial qol membrandan 130 Å kənara, sitozol boşluğuna uzanır.

NAD^+ yalnız iki elektron daşıyıcısıdır: o eyni zamanda bir cüt elektronu ya qəbul edir ya da buraxır. NADH-CoQ reduktazada, NADH-birləşdirən sayt periferial qolun ucunda yerləşir (Şəkil 12-23a), NADH-dan buraxılan elektronlar əvvəlcə, FAD-la yaxın (oxşar) olan prostetik qrup və ya koffaktor FMN-ə (flavin mononukleotidə) axır, sonra isə bu qolda təxminən 95Å aşağıda olan yeddi dəmir-kükürd klasterindən keçərək, sonda saytda membran müstəvisinə ən azı qismən birləşmiş vəziyyətdə olan CoQ-ə daşınırlar. FAD kimi, FMN iki elektronu qəbul edə bilir, amma bunları hər dəfəyə bir elektron olmaqla edir.

Hər bir daşınan elektronun potensialı təxminən 360 mV qədər enməyə məruz qalır, bu daşınan iki elektron üçün –16.6 kkal/mol qiymətində olan $\Delta G^{o\prime}$-ə ekvivalentdir. Buraxılan enerjinin çox hissəsi, kompleks I tərəfindən oksidləşmiş hər bir NADH molekuluna görə dörd protonunun daxili membrandan keçərək daşınmasına sərf olunur. Bu dörd proton, Şəkil 12-21, 12-22a və 12-23a-da təsvir edildiyi kimi, CoQ-ə köçürülən iki protondan fərqlidir. Periferial qolda elektron nəqliyyatı tərəfindən buraxılan enerjinin membran qolundakı subvahidlərin konformasiyasının dəyişilməsində istifadə olunduğu və beləliklə dörd protonun membranda hərəkətinin həyata keçirildiyi dəqiq mexanizm məlum deyil. Ehtimal olunur ki, üç proton, protonlaşa bilən və membrana sarınan polyar yan zəncirlərin ziqzaq seriyası ilə üç kation antiporter domenlərinindən keçir. Yan zəncirlərin buna bənzər sırası dördüncü proton üçün ehtimal olunan kanaldır. Membrana birləşmiş qolda köndələn α spiral (t-spiral) membran müstəvisinə parallel uzanır, antiporter domenini periferial qolla potensial mexaniki əlaqələndirir (Şəkil 12-23a) və yəqin ki, periferik qolda elektronların daşınması ilə ayrılan enerjini transmembran domenlərdə proton daşınmasına çevirmık üçün tələb olunan konformasiya dəyişikliyinə birbaşa kömək edir.

Bu komplekslə kataliz olunan ümumi reaksiya belədir:

$$\underset{\text{Reduksiya olunmuş}}{NADH} + \underset{\text{Oksidləşmiş}}{CoQ} + 6H^+_{daxil} \longrightarrow \underset{\text{Oksidləşmiş}}{NAD^+} + H^+_{daxil} + \underset{\text{Reduksiya olunmuş}}{CoQH_2} + 4\,H^+_{xaric}$$

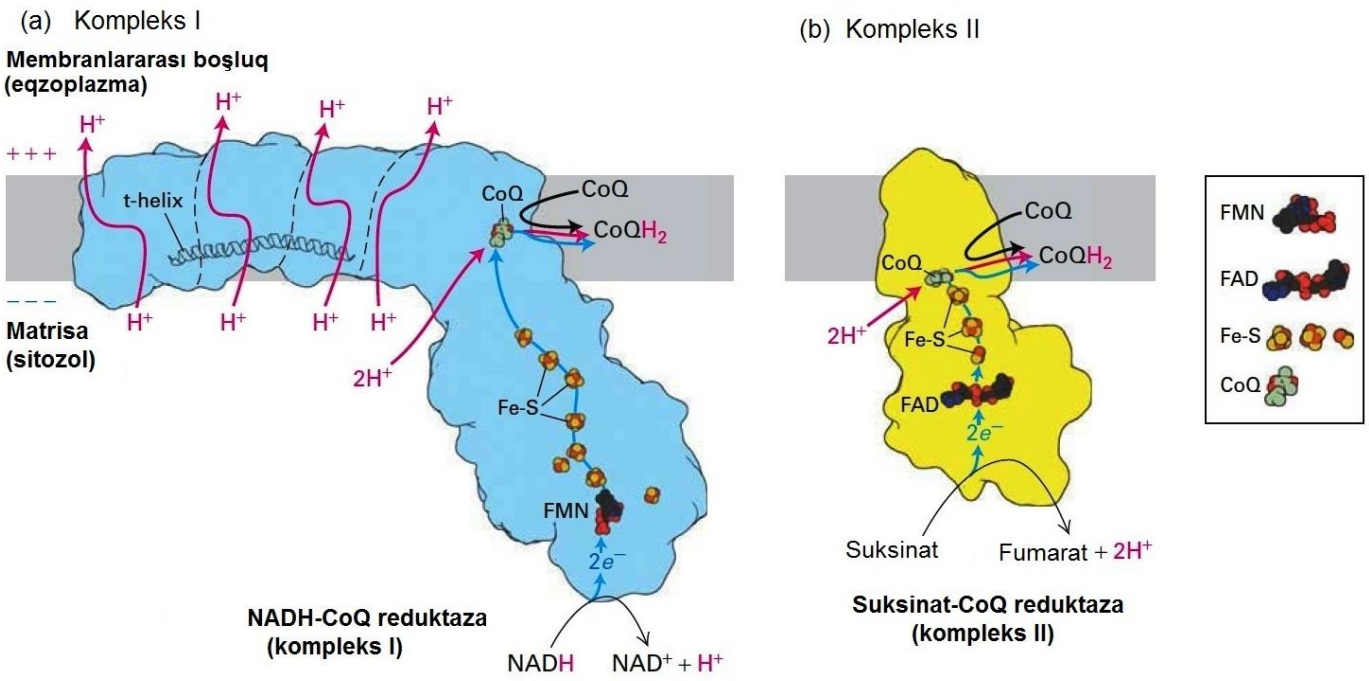
Suksinat-CoQ Reduktaza (Kompleks II) Limon turşusu tsiklində suksinat molekulunu fumarata oksidləşdirən (və prosesin gedişində reduksiya olunmuş koenzim $FADH_2$-ni yaradan) ferment Suksinat dehidrogenaza II kompleksin dörd subvahidindən biridir (Şəkil 12-23b). Beləliklə, limon turşusu tsikli fiziki olaraq və eləcə də fəaliyyətcə elektron nəqliyyat zənciri ilə əlaqəlidir. Suksinatın fumarata çevrilməsində azad olan iki elektron əvvəlcə suksinat dehidrogenazada FAD-a, sonra isə FAD-ı regenerasiya etməklə dəmir-kükürd klasterlərə ötürülür və sonda, II kompleksin transmembran hissəsinin matrisa tərəfindəki yarığa birləşən CoQ-ə ötürülür (Şəkillər 12-22b, 12-23b). Bu yol bir qədər I kompleksdəki yolu xatırladır (bax Şəkil 12-23a).

Bu komplekslə kataliz olunan ümumi reaksiya belə olacaq:

$$\underset{\text{(Reduksiya olunmuş)}}{\text{Suksinat}} + \underset{\text{(Oksidləşmiş)}}{CoQ} \longrightarrow \underset{\text{(Oksidləşmiş)}}{\text{Fumarat}} + \underset{\text{(Reduksiya olunmuş)}}{CoQH_2}$$

Baxmayaraq ki, bu reaksiya üçün $\Delta G^{\circ\prime}$ mənfidir, buraxılan enerji $CoQH_2$-ni əmələ gətirmək üçün CoQ-ün reduksiyası ilə yanaşı əlavə protonun vurulması üçün kifayət deyildir. Beləliklə, suksinat-CoQ reduktaza kompleksi ilə birbaşa membrandan heç bir proton translokasiya olunmur və tənəffüs zəncirinin bu hissəsində heç bir protom-hərəkətverici qüvvə də yaranmır. Biz tezliklə I və II komplekslər tərəfindən yaranan $CoQH_2$ molekullarında protonların və elektronların proton-hərəkətverici qüvvənin yaranmasına necə kömək etdiklərini görəcəyik.

Kompleks II, $FAD/FADH_2$ vasitəsi ilə aparılan oksidləşmə reduksiya reaksiyası ilə suksinatdan $CoQH_2$-ni yaradır. Matrisada və daxili mitoxondrial membranda başqa zülallar dəsti yağ asil CoA-dan $CoQH_2$-ni yaratmaq üçün $FAD/FADH_2$ ilə aparılan oksidləşmə reduksiya reaksiyaslarının müqayisə edilə bilən sırasını həyata keçirir. Suda həll olan ferment *yağ asil CoA dehidrogenaza* mitoxondri matrisasında yağ asil CoA-nın oksidləşməsinin birinci mərhələsini kataliz edir (bax Şəklil 12-18). Yağ asil zəncirlərinin müxtəlif uzunluqlarına spesifik olan bir sıra yağ asil CoA dehidrogenaza fermentləri mövcuddur. Bu fermentlər, yağ asil zəncirində β vəziyyətində olan karbonu oksidləşdirməklə (ona görə də tam proses β oksidləşmə adlandırılır) iki karbonu yağ asil qrupundan ayıran dörd mərhələli prosesdə ilkin mərhələni həyata keçirirlər. Bu reaksiyalar asetil CoA-nı yaradır, o da öz növbəsində limon turşusu tsiklinə daxil olur. Onlar həmçinin $FADH_2$ aralıq məhsulunu və NADH-ı yaradırlar. Kompleks II-də olduğu kimi, əmələ gələn $FADH_2$ reduksiya reaksiyası zamanı fermentə birləşmiş vəziyyətdə qalır. *Elektron daşıyan flavoprotein* (*ETF*) adlanan, suda-həll olan zülal yüksək-enerjili elektronları asetil CoA dehidrogenazada $FADH_2$-dən, daxili membranda CoQ-ni $CoQH_2$-ə reduksiya edən membran zülalı *elektron daşıyan flavoprotein:ubixinon oksidoreduktazaya* (*ETF:QO*) keçirir. Bu $CoQH_2$ membranda I və II komplekslər tərəfindən yaradılmış başqa $CoQH_2$ molekulları ilə qarışır, bunların hamısı kompleks III ilə matrisadan xaricə elektron daşınmasında iştirak edir.



ŞƏKİL 12-23 Elektron və protonların komplekslərdən (kompleks I ə II) keçərək daşınması. (a) Kompleks I-in üç-ölçülü quruluşa əsaslanan modeli. Maya *Y. lipolytica*-da əsas kompleks I-in formasının ümumi təsviri, rentgen-kristalloqrafiya ilə təyin olunduğu kimi, açıq mavi rəngdə göstərilir və fərqli quruluş subvahidlərini ayıran sərhədlər nazik qırıq qara xətlərlə işarələnir. Elektronlar əvvəlcə NADH-dan flavin mononukleotidə (FMN) axır, sonra isə dəmir-kükürd (Fe-S, qırmızı və sarı şarlar) klasteri vasitəsi ilə CoQ-ə axır, bura həmçinin matrisadan gələn iki proton birləşərək (qırmızı ox) $CoQH_2$-ni əmələ gətirir. CoQ-nin yükünün dəyişməsi ilə induksiya olunması mümkün olan və t-spiralın porşenəbənzər üfiqi yerdəyişməsinin daxil olduğu elektron axını nəticəsində əmələ gələn konformasiya dəyişiklikləri transmembran subvahidlər vasitəsi ilə, matrisadan membranlararası boşluğa (qırmızı oxlar) proton vurulmasını aparır. (b) II komleksin üç-ölçülü quruluşa əsaslanan modeli. Elektronlar II komplekslə suksinatdan FAD/$FADH_2$ və dəmir-kükürd klasterlər (Fe-S) vasitəsi ilə CoQ-ə axır, kompleks II-dən isə CoQ/$CoQH_2$ vasitəsi ilə kompleks III-ə axır. II kompleksdə suksinatın fumarata oksidləşməsi zamanı buraxılan elektronlar, əlavə proton translokasiyasını etmədən CoQ-nün $CoQH_2$-ə reduksiya olunmasında istifadə olunurlar. [(a) hissəsi V. Zickerman et al., 2015, *Science* **347**:44-49, PDB ID 3m9s. (b) hissəsi F. Sun et al., 2005, Cell 121: 1043-1057, PDB ID 1 zoy.]

$CoQH_2$-Sitoxrom c Reduktaza (kompleks III) Kompleks I və kompleks II və ya ETF:QO tərəfindən yaranan $CoQH_2$, iki elektronu $CoQH_2$-sitoxrom *c* reduktazaya (kompleks III) verərək oksidləşmiş CoQ-ni regenerasiya edir. Eyni zamanda o, öncə CoQ ilə matrisa boşluğunda götürülmüş iki protonu membranlararası boşluğa buraxaraq proton-hərəkətverici qüvvənin bir hissəsini yaradır (bax Şəkil 12-22). Kompleks III daxilində, buraxılmış elektron əvvəlcə kompleks daxilindəki dəmir-kükürd klasterinə, sonra isə sitoxrom c_1-ə və ya iki *b*-tip sitoxromlara (b_L və b_H, aşağıda Q tsiklinin təsvirinə bax) köçürülür. Nəhayət sonda, iki elektron ardıcıl olaraq sitoxrom *c*-nin oksidləşmiş formasının iki molekuluna, membranlararası boşluğa diffuziya edən suda həll olan periferial zülala ötürülür. Keçirilən hər bir cüt elektron üçün kompleks III ilə kataliz olunan ümumi reaksiya belədir:

$$\underset{\text{(Reduksiya olunmuş)}}{CoQH_2} + 2\ \text{Sit}\ c^{3+} + 2H^+_{\text{daxil}} \longrightarrow \underset{\text{(Oksidləşmiş)}}{CoQ} + 4\ H^+_{\text{xarıc}} + \underset{\text{(Reduksiya olunmuş)}}{2\ \text{Sit}\ c^{2+}}$$

Bu reaksiya üçün $\Delta G^{\circ\prime}$ kifayət qədər mənfidir, belə ki, köçürülmüş hər bir cüt elektron üçün $CoQH_2$-dən olan protonlara əlavə olunmuş iki proton daxili membranı keçərək mitoxondrial matrisadan translokasiya olunur, bu köçürülməyə aşağıda müzakirə olunan proton-hərəkətverici Q tsiklii daxildir. Hem zülalı sitoxrom *c* və lipiddə həll olan kiçik molekul CoQ elektron nəqliyyat zəncirində oxşar rolu oynayırlar, hər ikisi elektron nəqliyyat zəncirinin kompleksləri arasında elektronları (və beləliklə enerjini) ötürməklə mobil elektron şatlı kimi fəaliyyət göstərirlər.

Q tsikli Eksperimentlər göstərdi ki, kompleks III ($CoQH_2$-sitoxrom *c* reduktaza) ilə $CoQH_2$-dən daşınan hər bir elektron cütünə görə dörd proton membranda translokasiya olunur. Bu dörd proton, tsikl zamanı iki CoQ molekuluna çevrilən iki $CoQH_2$ molekulu ilə daşınan protonlardır. Amma, başqa bir CoQ molekulu matrisadan iki başqa protonu qəbul edib bir $CoQH_2$ moekuluna çevrilir. Beləliklə, xalis ümumi reaksiya, hər dəfəyə biri olmaqla iki elektron akseptor sitoxrom *c* molekuluna köçürüləndə, yalnız bir $CoQH_2$ moekulunn CoQ molekuluna çevrilməsini əhatə edir. Təkamül prosesində qorunub saxlanılmış *Q tsikli* adlanan mexanizm, protonların və elektronların kompleks III vasitəsi ilə ikisi-biri-üçün daşınmasına cavab verir (Şəkil 12-24).

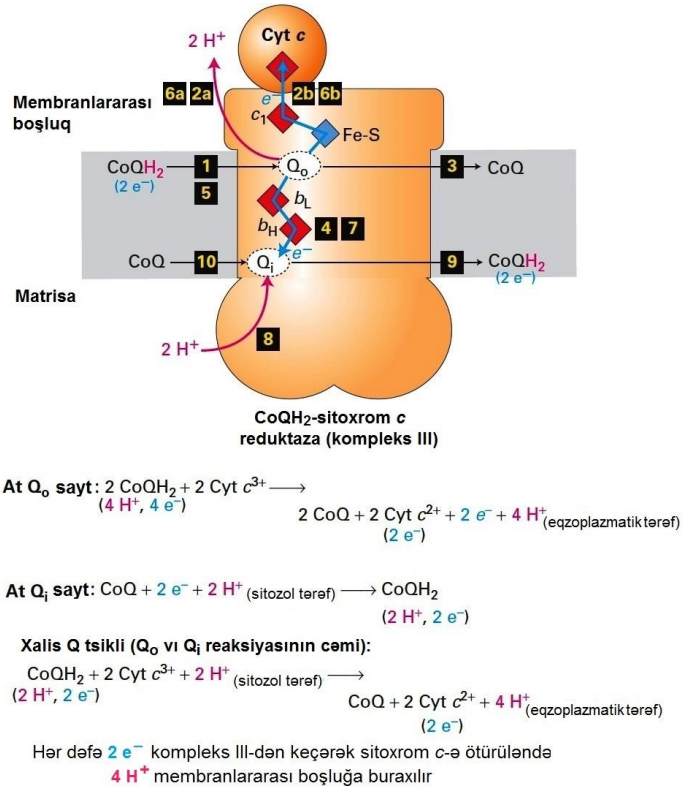
Kompleks III-ün substratı $CoQH_2$, bir sira fermentlər tərəfindən, o cümlədən NADH-CoQ reduktaza (kompleks I), suksinat CoQ reduktaza (kompleks II), *elektron daşıyan flavoprotein:ubixinon reduktaza* (β-oksidləşmə zamanı

ETF:QO) və bizim irəlidə görəcəyimiz kimi, III kompleksin özü tərəfindən yaradılır.

Şəkil 12-24-də göstərildiyui kimi, Q tsiklinin bir dövrəsində iki molekulu $CoQH_2$ kompleks III-ün Q_o mərkəzində CoQ-ə oksidləşir və ümumilikdə membranlararası boşluğa dörd protonu buraxır, amma Q_i mərkəzində CoQ-dən və matrisa boşluğunda iki əlavə protondan bir molekul $CoQH_2$ regenerasiya olunur. Translokasiya olunmuş protonların hamısı, yuxarıda qeyd olunduğu kimi, öz protonlarını matrisadan götürmüş $CoQH_2$-dən alınmışdir. Zahirən çətin görünsə də, Q tsikl kompleks III vasitəsilə hərəkət edən hər bir cüt elektrona görə vurulan protonların sayını optimallaşdırır. Q tsikli bütün heyvanlarda və bitkilərdə və eləcə də bakteriyalarda tapılmışdır. Görünür ki, onun hüceyrə təkamülinin çox erkən dövründə yaranması, bütün həyat formalarının yaşaması üçün, reduksiya olunmuş CoQ-dəki potensial enerjini membranda maksimum proton-hərəkətverici qüvvəyə çevrilmək yolu kimi çox vacib olmuşdur. Bu da öz növbəsində, elektron nəqliyyatı zəncirində NADH və ya $FADH_2$-dən O_2-ə hərəkət edən hər bir elektrona görə sintez olunan ATP molekullarının sayını maksimuma çatdırır.

Q_o mərkəzində $CoQH_2$-dən sərbəst buraxılan iki elektron müxtəlif akseptorlara, ya Fe-S, sitoxrom c_1, daha sonra da sitoxrom *c*-yə (Şəkil 12-24-də yuxarıya gedən yol), ya da alternativ olaraq sitoxrom b_L, sitoxrom b_H və sonra isə Q_i mərkəzində (saytda) olan CoQ-ə (Şəkil 12-14-də aşağıya gedən yol) necə yönəldilir? Bu mexanizmə, kompleks III-ün Fe-S-saxlayan zülal subvahidində dəyişkən həncama (flexible hinge) daxilidir. İlkin olaraq, $CoQH_2$-dən ona birləşmiş elektronları götürmək üçün, Fe-S klaster Q_o mərkəzinə kifayət qədər axın yerləşir. Bu baş verən kimi, zülalın Fe-S klasterinə malik olan bu seqmenti, elektron ötürülməsinin baş verməsi üçün klasteri Q_o mərkəzindən uzaqlaşdıraraq, sitoxrom c_1-də hemə kifayət qədər yaxın vəziyyətdə yerləşdirir. Fe-S subvahidi olan bu alternativ konformasiyada, Q_o mərkəzə birləşmiş $CoQH_2$-dən ayrılan ikinci elektron Fe-S klasterə keçə bilmir – o çox uzqdadır, ona görə də, o termodinamik cəhətdən nisbətən az səmərəli olan yolla sitoxrom b_L-ə və sitoxrom b_H-la Qi mərkəzdə olan CoQ-yə çatmaq üçün ona açıq olan alternativ yolu götürür.

Sitoxrom *c* Oksidaza (Kompleks IV) Sitoxrom *c*, kompleks III-dən alınan bir elektronla reduksiya olunduqdan sonra, o elektronunu sitoxrom *c* oksidazaya (kompleks IV) verərək oksidləşir (bax Şəkil 12-22a). Mitoxondrial sitoxrom *c* oksidazalar 13 müxtəlif subvahiddən ibarətdir, amma fermentin katalitik özəyi yalnız üç subvahiddən təşkil olunmuşdur. Qalan subvahidlərin fəaliyyəti hələ tam öyrənilməmişdir. Bakterial sitoxrom *c* oksidazalar yalnız üç katalitik subvahidə malikdir. Həm mitoxondridə həm də bakteriyada, dörd molekul reduksiya olunmuş sitoxrom *c* hər dəfə biri olmaqla oksidazaya birləşir. Elektron hər bir sitoxrom *c*-nin hemindən, əvvəlcə Cu_a^{2+} kimi nişanlanmış bir cüt mis ionlarına keçirilir, sonra isə sitoxrom *a*-nın heminə və ardınca Cu_b^{2+}-ə və sitoxrom a_3-ün heminə ötürülür, bunlar da birlikdə səndviç formasında birləşir və O_2 molekulunu müsadirə edirlər, o isə sonra iki H_2O molekuluna qədər reduksiya olunur. Bir sıra dəlillər göstərir ki, O_2 bir və ya daha artıq hidrofob kanallarla, O_2-nin su mühitinə nisbətən daha çox həll olduğu membranın hidrofob özəyindən zülal vasitəsilə keçərək reduksiya mərkəzinə çatır (bax Şəkil 12-22a).



ŞƏKİL 12-24 Q tsikl. Kompleks III-ün Q tsikli dörd protonu membranlararası sahəyə və iki elektroni iki sitoxrom *c* molekullarına keçirmək üçün $CoQH_2$ molekulunun xalis oksidləşməsindən istifadə edir. Tsikl membranda reduksiya olunmuş $CoQH_2$-nin birləşdirilmiş toplusunda (combined pool) molekulun III kompleksin transmembran zülalının *membranlararası sahəsi* (eqzolazmatik) *tərəfində* Q_o mərkəzinə birləşməsi ilə başlayır (pillə 1). Burada, $CoQH_2$ iki protonu membranlararsaı sahəyə buraxır (pillə 2a), iki elektron və nəticədə yaranan CoQ dissosasiya edirlər (pillə 3). Elektronlardan biri dəmir-sulfat zülalı və sitoxrom c_1 vasitəsi ilə birbaşa sitoxrom *c*-ə daşınır (pillə 2b). (Xatırladaq ki, hər bir sitoxrom *c* bir elektronu III kompleksdən IV kompleksə aparır.) Digər elektron, sitoxrom b_L və b_H-dan keçərək yerini dəyişir və kompleksin *matrisa* (*sitozol*) *tərəfində* ikinci mərkəzə, Q_i mərkəzinə birləşən oksidləşmiş CoQ molekulunu qismən reduksiya edərək CoQ semixinon anionunu, Q^{*-} əmələ gətirir (pillə 4). Proses ikinci $CoQH_2$-nin Q_o mərkəzinə birləşməsi (pillə 5), protonun buraxılması (pillə 6a), digər sitoxrom *c*-nin reduksiya olunması (pillə 6b) və başqa bir elektronun Q_i mərkəzinə birləşmiş Q^{*-}-a əlavə olunması (pillə 7) ilə təkrar olunur. Matrsadan iki protonun əlavə olunması Q_i mərkəzində tam reduksiya olunmuş $CoQH_2$ molekulunu yaradır, o isə sonra dissosasiya edir (pillələr 8 və 9), yeni CoQ molekulunun birləşməsi üçün Q_i sərbəst buraxlır (pillə 10), və Q tsikli təkrarən yenidən başlayır. Bax B. Trumpower, 1990, *J.Biol.Chem*. **265**:11409, və E. Darrouzet et al., 2001, *Trends Biochem. Sci*. **26**:445.

Dörd elektron nəhayət sonda, kompleks IV-lə sonuncu elektron akseptoru olan O_2-ə keçərək oksidləşmə reaksiyasının CO_2 ilə birlikdə son məhsullardan biri olan iki molekul H_2O əmələ gətirir. Oksigenin reduksiyasında ehtimal olunan aralıq məhsullara peroksid anion (O_2^{2-}) və yəqin ki, hidroksil radikalı (OH^*) və eləcə də dəmir və oksigen atomlarının qeyri adu kompleksləri daxildirlər. Bu aralıq məhsullar IV kompleksdən yan keçə bilsəydilər hüceyrə üçün zərərli olardılar, amma bu çox nadir hallarda baş verir (aşağıda reaktiv oksigen nümunələrinin

müzakirəsinə bax), çünki onlar Cu_b^{2+} və sitoxrom a_3-də hem ilə tutulurlar. Reduksiya olunmuş O_2-dən H_2O əmələ gətirmık üçün protonlar kanalla reduksiya mərkəzinə göndərilir. Bundan əlavə, başqa protonlar membrandan keçərək matrisadan membranlararası boşluğa daşınır. Dörd elektronun sitoxrom *c* oksidaza kompleksi ilə daşınması zamanı, matrisadan dörd protron membrandan keçərək translokasiya olunur. Beləliklə, IV kompleks keçirilən hər bir elektrona görə yalnız bir protonu daşıyır, halbuki III kompleks, Q tsiklindən istifadə edərək hər keçirilən elektrona görə iki proton daşıyır. Amma, IV kompleksin bu protonları translokasiya etməsi və energetik cəhətdən translokasiyanı O_2 reduksiyası ilə bağlaması mexanizmi hələ aydın deyildir.

Keçirilən hər dörd elektrona görə sitoxrom *c* oksidaza ilə kataliz olunan ümumi reaksiya belə olacaq:

$$4\ \underset{\text{(Reduksiya olunmuş)}}{\text{Sit } c^{2+}} + 8\ H^+_{\text{daxil}} + O_2 \longrightarrow 4\ \underset{\text{(Oksidləşmiş)}}{\text{Sit } c^{3+}} + 2\ H_2O + 4\ H^+_{\text{xaric}}$$

Hərbi sursat kimi istifadə olunan, cəsuslar tərəfindən tutularkən özünə qəsd kimi istifadə edilən, qaz kameralarında məhbusları edam edərkən və Faşistlər tərəfindən yəhudilərin və başqalarının kütləvi qırğını zamanı istifadə edilən qaz (Ziklon B qazı) sianid zəhəri idi, çünki o, mitoxondrial sitoxrom *c* oksidazada (kompleks IV) a_3 heminə birləşərək elektron nəqliyyatını və beləliklə də oksidadiv fosforlaşmanı və ATP istehsalını ingibirləşdirir. Sianid çoxsaylı kiçik toksik molekullardan biri olub mitoxondridə enerji istehsalına mane olur.

Elektron Nəqliyyat Zəmcirində Elektron Daşıyıcılarının Reduksiya Potensialı Elektronların NADH-dan O_2-ə Axmasını Gücləndirir

Fəsil 2-də gördüyümüz kimi, parsial reduksiya reaksiyası üçün **reduksiya potensialı** (***E***)

$$\text{Oksidləşmiş molekul} + e^- \rightleftharpoons \text{reduksiya olunmuş molekul}$$

həmin parsial reaksiya üçün tarazlıq sabitinin ölçüsüdür. Kompleks III-də *b* sitoxromlar ($CoQH_2$-sitoxrom *c* reduktaza) istisna olmaqla, elektron daşıyıcılarının standart reaksiya potensialı $E°'$ davamlı olaraq NADH-dan O_2-ə qədər artıq. Məsələn, parsial reaksiya üçün

$$NAD^+ + H^+ + 2\ e^- \rightleftharpoons NADH$$

standatrt reduksiya potensialının qiyməti –320 mV-dur, bu iki elektronun ötürülməsi üçün +14.8 kkal/mol $\Delta G°'$ qiymətinə ekvivalentdir. Beləliklə bu parsial reaksiya sol tərəfə davam etməyə meyillidir, bu NADH-ın NAD^+-a oksidləşməsi istiqamətidir.

Əksinə, parsial reaksiya üçün standart reduksiya potensialı

$$\text{Sitoxrom } c_{\text{oks}}\ (Fe^{3+}) + e^- \rightleftharpoons \text{sitoxrom } c_{\text{red}}\ (Fe^{2+})$$

bir elektronun ötürülməsi üçün +220 mV-dur ($\Delta G°` = –5.1$ kkal/mol). Beləliklə bu qismən (parsial) reaksiya sağ istiqamətdə getməyə daha meyillidir, bu sitoxrom *c* (Fe^{3+})-dən sitoxrom c (Fe^{2+})-ə reduksiya istiqamətidir.

Tənəffüs zəncirinin son reaksiyası, O_2-nin H_2O-a qədər reduksiyası

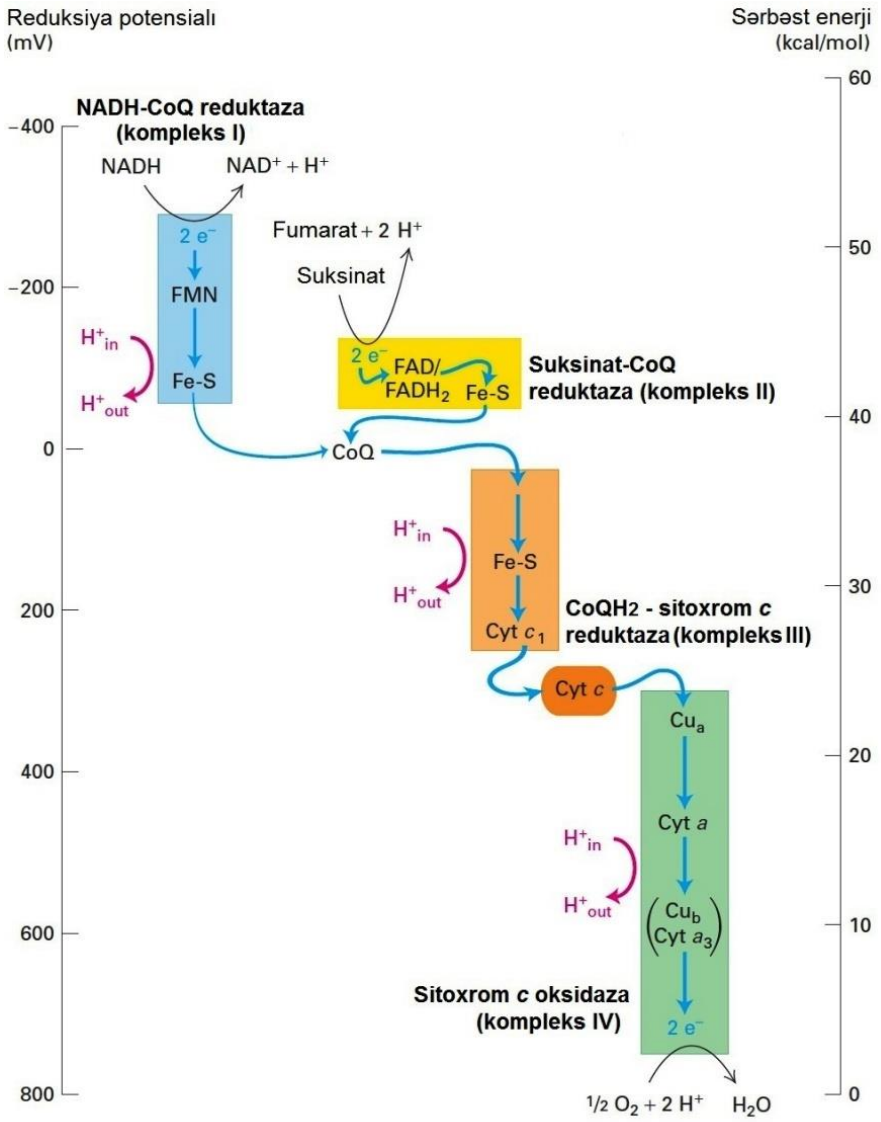
$$2\ H^+ + ½\ O_2 + 2\ e^- \rightarrow H_2O$$

+816 mV standart reduksiya potensialına (iki elektronun ötürülməsi üçün $\Delta G°' = –37.8$ kkal/mol) malikdir, bu bütün reaksiyalar sırasında ən müsbətdir; beləliklə bu reaksiya da sağ istiqamətdə getməyə meyillidir.

Şəkil 12-25-də təsvir edildiyi kimi, elektron nəqliyyat zəncirində $E°'$ qiymətlərindəki davamlı artma və $\Delta G°'$ qitmətlərindəki uyğun azalma elektronların NADH və $FADH_2$-dən (suksinatdan yaranmış) O_2-ə axmasına üstünlük verir. Elektronların elekton nəqliyyat zənciri komplekslərində energetik cəhətdən "aşağıya doğru" axmasından ayrılan enerji protonların daxili mitoxondrial membranda onların qatılıq qradientlarınə qarşı vurulmasını təmin edir.

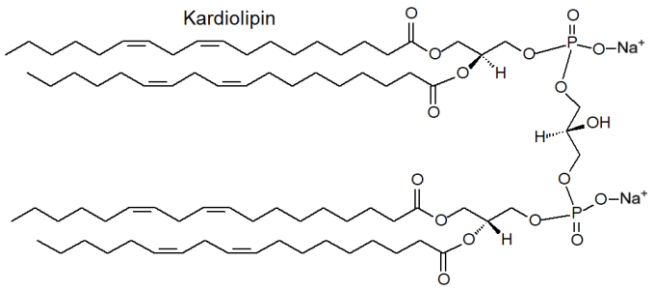
Elektron Nəqliyyat Zəncirinin Multizülal Kompleksləri Superkomplekslərdə Toplanırlar

50 ildən artıq bundan öncə, Britton Çanse guman edirdi ki, elektron nəqliyyat kompleksləri ola bilsin ki, daha böyük superkomplekslərdə toplanırlar. Bu cürə etmək, kompleksləri yüksək dərəcədə təşkil olunmuş birbaşa yaxınlığa gətirəcəkdir, bu da ümumi proseslərin sürətini və səmərəliliyini artıra bilər. Həqiqətən də, genetik, biokimyəvi və biofiziki tədqiqatlar elektron nəqliyyat zəncirinin superkomplekslərinin mövcud olmasını çox güclü dəlillərlə sübut etdi. Bu tədqiqatlarda, çox böyük makromolekulyar zülal komplekslərini ayırmağa və onların üç-ölçülü quruluşlarını elektron mikroskopik analiz etməyə imkan verən mavi-təbii (blue-native) (BN)-PAGE və rəngsiz təbii (colorless-native) (CN)-PAGE adlanan gel elektroforez metodları istifadə edildi. Belə superkomplekslərdən biri, I kompleksin bir nüsxəsinə, III kompleksin dimerinə (III_2) və IV kompleksin bir və ya daha artıq nüsxəsinə malikdir (Şəkil 12-26). Göstərilmişdir ki, bu $I/III_2/IV$ superkompleks ubixinonla (CoQ) və sitoxrom *c* ilə (BN)-PAGE geldən ayrılarkən elektronları NADH-dan O_2-ə ötürür, başqa sözlə, bu superkompleks tənəffüs edə bilir – o ***respirasomdur***, yəni tənəffüsedəndir. Daxili mitoxondrial membranın çox yüksək zülal qatılığı kontekstində, superkompleks əmələ gəlməsinin dəqiq funksiyası, əminliklə öz təyinini gözləyir, amma guman olunur ki, buraya elektron nəqliyyatının sürətinin və səmərəliliyinin yaxşılaşdırılması, çoxzülallı komplekslərin fərdi stabilləşdirilməsi və ya lazımsız zülal aqreqasiyalarının qarşısının alınması daxildirlər.

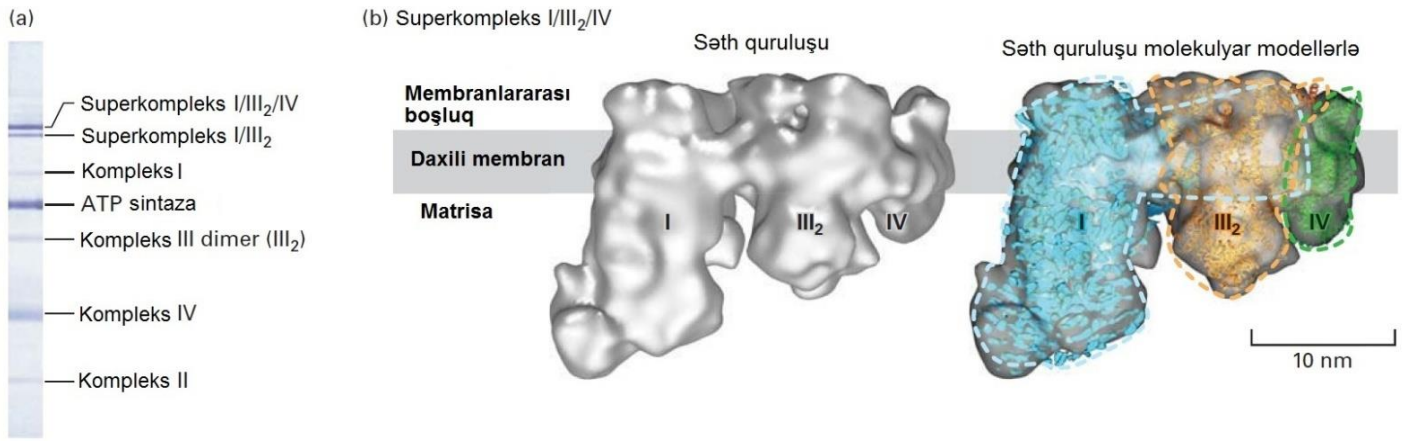


ŞƏKİL 12-25 Elektronların elektron-nəqliyyat zəncirində pilləli axması zamanı oksidləşmə-reduksiya potensialında və sərbəst enerjidə dəyişilmə. Mavi oxlar elektronların axmasını göstərir; qırmızı oxlar daxili mitoxondrial membranda protonların translokasiyasını göstərir. Elektronlar multizülal komplekslərindən aşağı reduksiya potensialı olanlardan daha yüksək (daha çox müsbət) reduksiya potensialı olanlara (sol şkala) doğrü sərbəst enerjidə müvafiq azalma ilə (sağ şkala) keçirlər. Elektronların üç kompleksdən keçməsi zamanı azad olan enerji H^+ ionlarının membrandan (nasosla) vurulmasını təmin etmək üçün və proton-hərəkətverici qüvvəni yaratmaq üçün kifayətdir.

Aşkar olunmuşdur ki, unikal fosfolipid *kardiolipin* (difosfatidil qliserin), bu superkomplekslərin toplanmasında və fəaliyyətində əhəmiyyətli rol oynayır.



Ümumiyyətlə eukaryot hüceyrələrin başqa membranlarında müşahidə olunmayan kardiolipin, aşkar olunmuşdur ki, daxili mitoxondri membranında inteqral membran zülallarına (məsələn, kompleks II) birəşir. Kardiolipinin sintezinin blok olunduğu maya mutantları üzərində aparılmış genetik və biokimyəvi tədqiqatlar aşkar etdi ki, kardiolipin mitoxondrial superkomplekslərin formalaşmasına fəallığına kömək edir, ona görə də, elektron nəqliyyat zəncirini dəqiq mexanizmi hələ də müəyyən edilməmiş qalan bir kompleksdə saxladığına görə, onu yapışqan adlandırırlar. Bundan əlavə, sübut olunmuşdur ki, kardiolipin daxili membranın protonlara birləşməsinə və keçiriciliyinə və beləliklə uyğun olaraq proton-hərəkətverici qüvvəsinə təsir edir. Bart sindromu insanda kardiolipinin asil zəncirinin quruluşunu müəyyən edən fermentdə qüsuru olan X-əlaqəli genetik xəstəlikdir. Barz sindromlu xəstələrdə kardiolipinin miqdarında azalma və onun anormal quruluşu ürəyin və skelet əzələlərinin qüsuru ilə, inkişafın ləngiməsi və digər anormallıqlarla nəticələnir.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 12-26 Elektroforez və elektron mikroskopiya təsvirləri I, III və IV komplekslərə malik olan elektron nəqliyyat zənciri superkomplekslərini təyin etdi. (a) Öküz ürəyinin mitoxondrisindən ayrılmış membran zülalları detergentlə həll edilmiş və komplekslər və super komplekslər (BN)-PAG metodundan istifadə edərək gel elektroforezi ilə ayrılmışdırlar. Gel daxilində mavi rənglənmiş hər bir bənd, qeyd olunan zülal komplekslərini və ya superkomplekslərini göstərir. Mavi ləkənin intensivliyi təqdim olunan kompleksin və ya superkompleksin miqdarına təxminən proporsionaldır. (b) Superkompleks $I/III_2/IV$ BN-PAGE geldən ekstraksiya olunmuş, dondurulmuş və krioelektron tomoqrafiyası ilə vizuallaşdırılmışdır. Soldakı təsvir membranın ehtimal olunan müstəvisinə parallel olan orientasiyadan baxılan üç-ölçülü səth quruluşunu göstərir. Sağdakı təsvir soldakı təsvirdəki fərdi komplekslərin quruluşlarının modelinə uyğunlaşdırılan eyni quruluşdur: kompleks I (mavi), dimer kompleks III (narıncı) və kompleks IV (yaşıl). Rənglənmiş ştrixlənən xətlər bu komplekslərin təxmini cizgilərini göstərir. Kompleks I-in quruluşu 14 əsas subvahidlərə deyil, yalnız maya *Y. lipolytica*-dakı tam kompleks I-in quruluşuna əsaslanır. [(a) hissəsi Schafer, E., et al., "Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes," *J. Biol. Chem.* 2006 Jun 2; **281**(22):15370-5. Epub 2006 Mar 20. (b) hissəsi *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 2011, **108**(37):15196-15200, Şəkil. 2A və 3A, "Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography," by Dudkina et al.

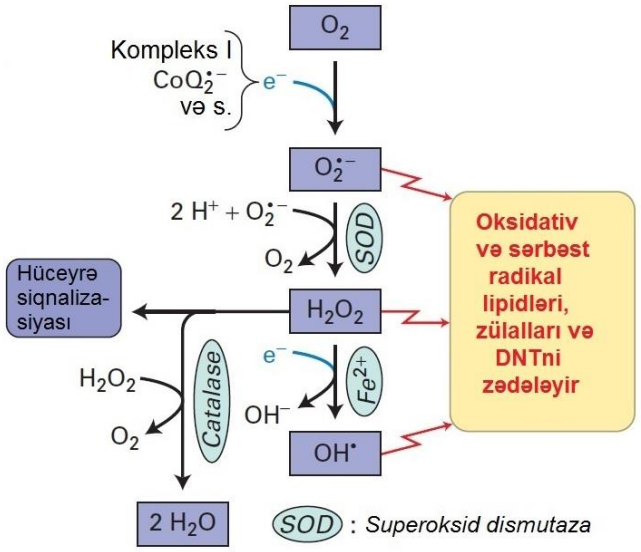
Reaktiv Oksigen Nümunələri Elektron Daşınmasının Əlavə Zəhərli Məhsullarıdır

Aerob orqanizmlər tərəfindən metabolizmə daxil olan oksigenin təxminən 1-2 faizi suya çevrilmək əvəzinə, qismən reduksiya olunaraq superoksid anion radikallarına çevrilir ($O_2^{\bullet-}$, burada "nöqtə" cütləşməmiş elektronu göstərir). Radikallar xarici elektron təbəqəsində (valentliyində) bir və ya daha artıq cütləşməmiş elektronları olan atomlardır və ya belə atomlara malik olan molekullardır. Radikalların hamısı deyil, amma əksər hissəsi, bir qayda olaraq yüksək kimyəvi reaktivliyə malik olurlar və qarşılıqlı təsirdə olduqları molekulların quruluşunu və xassəsini dəyişirlər. Belə reaksiyaların məhsulları çox zaman özü-özlüyündə radikaldırlar, ona görə də, çox sayda əlavə molekulları dəyişə bilən zəncirvari reaksiyanı yarada bilirlər. Superoksid və başqa yüksək reraktiv oksigenə malik olan molekullar, həm radikallar (məsələn, $O_2^{\bullet-}$) həm də qeyri radikallar (məsəılən hidrogen peroksid, (H_2O_2) *reaktiv oksigen nümunələri* (*reactive oxygen species – ROS*) adlanırlar. ROS böyük maraq doğurur, çünki onlar əsas bioloji molerkullarla, məsələn lipidlərlə (xüsusən doymamış yağ turşuları və onların törəmələri ilə), zülallarla və DNT ilə reaksiyaya girib onları dağıda və normal fəaliyyətlərinə mane ola bilirlər. Orta səviyyədən yüksək səviyyəyə qədər ROS nəyə təsir edirsə, ona çox zaman *hüceyrənin oksidativ stersi* deyilir və yüksək dərəcədə toksik olur. Həqiqətən də, ROS bədənin müdafiə hüceyrələri (məsələn, makrofaqlar, neytrofillər) tərəfindən məqsədyönlü şəkildə patogenləri məhv etmək üçün yaradılır. İnsanlarda, həddən artıq miqdarda və ya arzu olunmayan dərəcədə ROS yaranması çoxsaylı müxtəlif xəstəliklərlə, o cümlədən ürək çatışmazlığı, neyrodegenrativ xəstəliklər, alkaqolla-induksiya olunan qaraciyər xəstəliyi, diabetlər və (erkən) qocalma ilə əlaqəlidir.

Baxmayaraq ki, hüceyrədə ROS yaranmasının bir neçə mexanizmi mövcuddur, eukaryot hüceyrələrdə əsas mənbə mitoxondrilərdə (və ya aşağıda təsvir oliunduğu kimi xloroplastlarda) elektron nəqliyyatıdır. Elektronlar mitoxondrinin elektron nəqliyyat zəncirindən keçərkən molekulyar oksigeni (O_2) reduksiya etmək və siuperoksid anionlarını yaratmaq üçün kifayət qədər enerjiyə malik olurlar (Şəkil 12-27, *yuxarıda*). Amma, bu yalnız o zaman baş verə bilir ki, molekulyar oksigen zəncirdə reduksiya olunmuş elektron daşıyıcıları ilə (dəmir, FMN, $CoQH_2$) çox yaxın əlaqəyə girir. Adətən, belə əlaqəyə daşıyıcıların orada iştirak edən zülallarla əhatə olunması ilə mane olunur. Amma, bəzi mərkəzlərdə (xüsusən də kompleks I və $CoQ^{\bullet-}$, bax Şəkil 12-21) və bəzi şəraitdə (məsələn, matrisada yüksək NADH/NAD^+ nisbətində, ATP əmələ gəlməyəndə yüksək proton-hərəkətverici qüvvəsi) elektronlar "asanlıqla" zəncirdən kənara axa bilir və O_2-ni $O_2^{\bullet-}$ radikalına reduksiya edə bilir.

Superoksid anion xüsusilə qeyri-stabil və reaktiv ROS-dur. Mitoxondri, superoksid fəallığını əvvəlcə H_2O_2-ə (SOD adlanan Mn-a malik olan superoksid-dismutaza), sonra da H_2O çevirərək (katalaza) dayandıran fermentlərdən istifadə etməklə $O_2^{\bullet-}$ toksikliyinə qarşı bir sıra müdafiə mexanizmlərini yaratmışdır (Şəkil 12-27). $O_2^{\bullet-}$ yüksək dərəcədə reaktiv və zəhərli olduğundan SOD və katalaza bu vaxta qədər məlum olan ən cəld fəaliyyət göstərən fermentlərdəndir. SOD mitoxondri daxilində və hüceyrənin başqa kompartmentlərində tapılmışdır. Hidrogen peroksid özlüyündə ROS-dur və asanlıqla membrandan

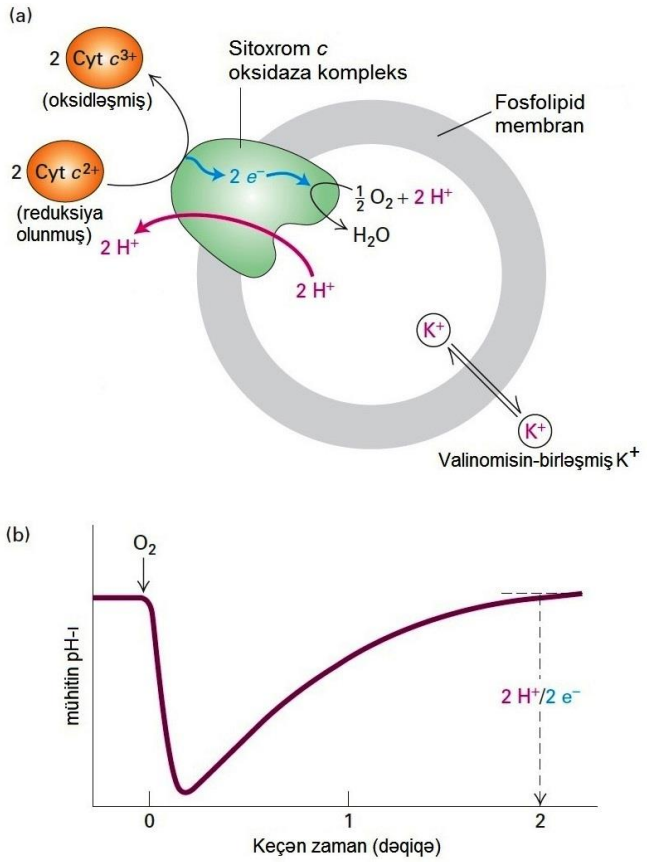
diffuziya edə bilir və hüceyrədə bütün molekullarla reaksiyaya girə bilir.



ŞƏKİL 12-27 Zəhərli reaktiv oksigen nümunələrinin yaradılması və fəalsızlaşdırılması. Mitoxondri və xloroplastlarda elektron nəqliyyat zəncirində yaranan və eləcə də başqa fermentativ reaksiyalarla yaranan elektronlar molekulyar oksigeni (O_2) reduksiya edir və yüksək reaktivliyə malik olan anion superoksidi ($O_2^{\bullet-}$) yaradırlar. Superoksid dismutaza (SOD) vasitəsi ilə superoksid sürətlə hidrogenperokdsidə (H_2O_2) çevrilir, o isə öz növbəsində Fe^{2+} kimi metal ionları ilə hidroksil radikallarına ($OH^{\bullet}$) çevrilə bilir və ya katalaza kimi fermentlərlə suya çevrilərək fəallığını itirir. Yüksək kimyəvi reaktivliklərinə görə $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2, $OH^{\bullet}$ və bunlara bənzər molekullar reaktiv oksigen nümunələri (ROS) adlandırılır. Onlar, çox biomolekullarda, o cümlədən lipidlərdə, zülallarda və DNT-də oksidativ və sərbəst radikal zədələnmələrini əmələ gətirirlər. Bu zədələnmələr hüceyrədə müxtəlif xəstəlikləri əmələ gətirən oksidativ srtesin yaranmasına səbəb olur, əgər bu kifayət qədər kəskin olarsa hüceyrənin ölümü ilə nəticələnir. Bundan başqa ROS hüceyrədaxili və hüceyrəxarici siqnal molekulu kimi də fəaliyyət göstərə bilir.

O həmçinin bəzi metallarla, məsələn Fe^{2+} ilə hətta daha təhlükəli müxtəlif hidroksil ($OH^{\bullet}$) radikallarına çevrilə bilir. Beləliklə də, hüceyrələr H_2O_2-in katalaza və başqa fermentlərlə, məsələn ROS-un doymamış yağ asil qrupları ilə reaksiyaya girərək əmələ gətirdiyi lipid hidroperoksid məhsullarını da zərərsizləşdirən peroksiredoksin və qlutation reduktaza ilə fəalsızlaşmasından asılıdır. Vitamin E, α-lipoik turşusu kimi kiçik molekullu antioksidant radikal "scavenger"lər ("zibilatan") də həmçinin, oksidativ stresə qarşı müdafiə sistemləridirlər. Baxmayaraq ki, çox hüceyrələrdə katalaza yalnız peroksisomlarda yerləşir, o ürək əzələ hüceyrələrindəki mitoxondrilərdə də tapılmışdır. Bu təccübli deyildir, çünki məməlilərdə ürək hər qram toxuma çəkisinə görə ən çox oksigen sərf edən orqandır.

ROS istehsalının sürəti mitoxondridə və xloroplastlarda bu orqanoidlərin metabolik vəziyyətini əks etdirdiyindən (məsələn, proton-hərəkətverici qüvvənin qiyməti, NADH/NAD^+ nisbəti) hüceyrələr orqanoidin metabolik vəziyyətini yoxlayan (monitor edən) və uyğun olaraq cavab verən ROS/Reduksiyaya-həssas transkripsiya faktoru kimi, məsələn orqanoid-spesifik zülalları kodlaşdıran nüvə genlərinin transkripsiyasının sürətini dəyişən, ROS-a həssas sistemi inkişaf etdirmişlər. Həmçinin göstərilmişdir ki, H_2O_2 fizioloji cəhətdən uyğun olan hüceyrədaxili və hüceyrələrarası siqnal molekulu kimi fəaliyyət göstərir. Göstərilmişdir ki, ROS aşağı oksigen səviyyələrinə uyğunlaşma (hopoksiya) və stress, hüceyrə proliferasiyasının boy faktorları və qidalanma ilə tənzimlənməsi, hüceyrə differensasiyası, tənzimlənən hüceyrə ölümü və autofaqiya kimi geniş müxtəliflikdə hüceyrə proseslərində iştirak edir.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 12-28 Sitoxrom *c* oksidaza (kompleks IV) vasitəsi ilə reduksiya olunmuş sitoxrom *c*-dən O_2-ə elektron nəqliyyatı proton nəqliyyatı ilə qovuşur. Sitoxrom *c* oksidaza kompleksi xarici səthdə yerləşən, sitoxron *c* üçün olan birləşmə mərkəzi ilə liposomlara daxil edilir.(a) O_2 və reduksiya olunmuş sitoxrom *c* əlavə edildikdə, H_2O əmələ gətirmək üçün elektronlar O_2-ə keçirilir və protonlar qovucuqların daxilindən onun xarici mühitinə daşınır. H^+ translokasiyası ilə əmələ gələn gərginlik qradientini dağıtmaq üçün valinomisin adlanan dərman mühitə əlavə edilir, əks halda o membrandan keçən protonların sayını azaltmalıdı. (b) Mühitin pH-nın monitorinqi aşkar etdi ki, O_2-nin əlavə olunmasının ardınca pH kəskin enir. Reduksiya olunmuş sitoxrom *c* tam oksidləşən kimi, protonlar geriyə, qovucuğa axır və mühitin pH-ı yenidən öz əvvəlki qiymətinə qayıdır. Ölçmələr göstərdi ki, hər reduksiya olunan bir O atomu üçün iki proton daşınır. Bir O atomunu redksiya etmək üçün iki elektron tələb olunur, amma, sitoxrom *c* yalnız bir elektronu keçirir; beləliklə, hər bir reduksiya olunmuş O üçün iki molekul sitioxrom c^{2+} oksidləşir. Bax B.Reynafarje et al., 1986, *J.Biol.Chem*. **261**:8254.

Təmizlənmiş Elektron Nəqliyyat Zəncirindən İstifadə Edilən Eksperiment Proton Vurulmasının Stoixiometriyasını Yaratdı

Elektron nəqliyyatı zəncirinin çoxzülallı komplekslərinin proton vurulmasını həyata keçirmələri mitoxondrial membranların detergentlə selektiv ekstratraksiyası, hər bir kompleksin demək olar ki, təmiz formada ayrılması və hər bir kompleksə malik olan süni fosfolipid qovucuqların (liposomlar) hazırlaması ilə həyata keçirirlmişdir. Belə liposomara müvafiq elektron donor və elektron akseptor əlavə olunduqda, əgər membrana yüklənmiş kompleks proton daşıyırsa, mühitdə pH-ın dəyişməsi baş verəcək (Şəkil 12-28). Bu tip tədqiqatlar göstərir ki, NADH-CoQ reduktaza (kompleks I) daşınan hər bir cüt elektrona görə dörd protonu translokasiya edir, halbuki sitoxrom *c* oksidaza (kompleks IV) daşınan bir cüt elektrona görə iki protonu translokasiya edir.

Müasir dəlillər göstərir ki, NADH-dan O_2-ə keçirilən hər bir elektron cütünə görə matrisa boşluğundan cəmisi 10 proton daxili mitoxondrial membranı keçərək daşınır (bax Şəkil 12-22). Suksinat-CoQ reduktaza (kompleks II) protonları daşımadığından və elektronlar suksinat-törəməli $FADH_2$-dən gələndə kompleks I-dən yan keçdiyindən, bu $FADH_2$-dən O_2-ə daşınan hər bir elektron cütünə görə yalnız altı proton daxili membrandan keçərək daşınır

Mitoxondridəki Proton-Hərəkətverici Qüvvə Əsasən Dxili Membrandan Keçən Gərginlik Qradientinə Bağlıdır

Elektron nəqliyyat zəncirinin əsas nəticəsi proton-hərəkətverici qüvvəsinin yaradılmasıdır, bu eyni zamanda mitoxondrinin daxili membranında transmembran proton qatılığı (pH) qradientinin və elektrik potensialı və ya gərginlik qradientinin cəmidir. Bu iki komponentin total proton-hərəkətverici qüvvəsinə nisbi töhfəsi eksperimental yolla təyin edilmişdir və o, membranın H^+-dən başqa digər ionlara olan keçiriciliyindən asılıdır. Əhəmiyyətli dərəcədə gərginlik qradienti, membranın digər kation və anionlara zəif keçirici olması zaman yaranır. Əks halda, anionlar protonlarla birlikdə matrisadan membranlararası boşluğa sızardı və gərginlik qradientinin yaranmasına mane olardı. Buna oxşar olaraq, əgər H^+-dən başqa digər kationlar membrandan H^+-in əksi istiqamətində (membranlararası boşluqdan matrisaya) sızarsa, bu sızma protonlar tərəfindən membranlararası boşluğa gələn yükləri tarazlaşdırardı, gərginlik qradientinin yaranmasına qısa-qapanma verərərdi. Həqiqətən də, daxili mitoxondrial membran H^+-dən başqa digər ionlar üçün zəif keçiricidir. Beləliklə, protonun vurulması gərginlik qradientini yaradır, bu da yüklərin itələnməsinə görə əlavə protonların keçib getməsini energetik cəhətdən çətin edir. Bunun nəticəsində elektron nəqliyyat zənciri vasitəsi ilə proton vurulması, kiçik pH qradienti kontekstində möhkəm gərginlik gradientini yaradır.

Mitoxondrilər elektrodların daxilə keçirilmsi üçün həddən artıq kiçik olduğundan, daxili membranda elektrik potensialı və pH qradientini birbaşa ölçmək mümkün deyil. Amma, tənəffüs edən mitoxondrinin suspenziyasına radioaktiv $^{42}K^+$ ionlarını və çox cüzi miqdarda valinomisini əlavə etməklə və matrisada toplanan radioaktivliyi ölçməklə elektrik potensialını dolayı yolla ölçmək olur. Baxmayaraq ki, normal halda daxili membran K^+ ionlarına keçirici deyildir, lipiddə həll olan kiçik molekul valinomisin *ionofordur*, spesifik ionlara (indiki halda K^+ ionuna) selektiv birləşir və onu keçirici olmayan membrandan daşıyır. Valinomisinin iştirakı ilə, $^{42}K^+$ ayrılmış mitoxondrinin daxili membranında elektrik potensialına müvafiq olaraq tarazlaşır: membranın matrisa tərəfi nə qədər çox mənfi olarsa, bir o qədər çox $^{42}K^+$ matrisaya cəzb olunacaq və toplanacaq.

Tarazlıqda radioaktiv K^+ ionlarının matrisada ölçülmüş qatılığı, $[K_{daxil}]$ ətraf mühitdəkinə $[K_{xaric}]$ nisbətən 500 dəfə çoxdur. Bu qiymətlərin Nernest bərabərliyinə (Fəsil 11) yazılması tənəffüs edən mitoxondrilərin daxili membaranının elektrik potensialını *E* (mV-la), matrisa (daxili) tərəfi mənfi olmaqla –160 mV göstərir:

$$E = -59\ log\ \frac{[K_{daxil}]}{[K_{xaric}]} = -59 \log 500 = -160\ mV$$

Tədqiqatçılar matrisa (daxili) pH-nı daxili mitoxondrial membrandan əmələ gəlmiş, membranın matrisa tərəfi içəriyə baxan qovucuqlar daxilində pH-a həssas fluoressent boyanı tutmaqla ölçə bilərlər. Onlar həmçinin qovucuqların xaricində (membranlar arası boşluğa ekvivalent) olan pH-ı və beləliklə pH qradientini də (ΔpH) ölçə bilir, bu da təxminən bir pH vahidinə bərabər olur. Bir pH vahidinin fərqi H^+ qatılığında on qat fəqi təmsil etdiyindən, Nernest tənliyinə görə bir vahidin pH qradienti membran tərəflərində 20°C-də 59 mV elektrik potensialına ekvivalent olacaq. Beləliklə, gərginlik və pH qradientini bilməklə biz proton-hərəkətverici qüvvəni (**pmf**) belə hesablaya bilərik:

$$\text{pmf} = \Psi - \left(\frac{RT}{F} \times \Delta\text{pH}\right) = \Psi - 59\ \Delta\text{pH}$$

burada *R* 1.987 kal/(dərəcə • mol) qaz konstantı, *T* temperatur (dərəcə Kelvinlə), *F* faradey konstantı [23052 ca/(V • mol)] və Ψ transmembran elektrik potensialıdır; Ψ və **pmf** millivoltla ölçülür. Elektrik potensialı Ψ daxili membranda –162 mV-dur (daxildə matrisada mənfi) və ΔpH təxminən 60 mV-a ekvivalentdir. Beləliklə, transmembran elektrik potensialı ümumi (total) potensialın 73 faizini təşkil etməklə ümumi (total) proton-hərəkətverici qüvvəsi (pmf) –220 mV-dur.

12.4 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Elektron-nəqliyyat Zənciri və Proton-Hərəkətverici Qüvvəsinin Yaranması

- Limon turşusu tsiklinin sonunda (II mərhələ) ilkin olaraq qlükozanın və yağ turşularının kovalent rabitələrində saxlanılan enerjinin əksəriyyəti reduksiya olunmuş koenzimlər NADH və $FADH_2$-də yüksək-enerjili elektronlara çevrilir. Bu elektronlardakı enerji proton-hərəkətverici qüvvəsinin yaranması üçün istifadə olunur.
- Mitoxondridə, proton-hərəkətverici qüvvə elektron axınının (NADH və $FADH_2$-dən O_2-ə) protonların matrisadan daxili membranla membranlararası boşluğa, energetik cəhətdən yuxarıya istiqamətdə daşınması ilə cütləşməsi nəticəsində yaranır. Bu proses, proton-hərəkətverici qüvvə vasitəsi ilə aparılan ADP və P_i-dan ATP-nin sintezi ilə birlikdə oksidadtiv fosforlaşma adlanır.

- Elektronlar $FADH_2$ və NADH-dan O_2-ə axarkən onlar çox zülallı komplekslərdən keçirlər. Bu dörd əsas kompleksə NADH-CoQ reduktaza (I kompleks), suksinat-CoQ reduktaza (II kompleks), $CoQH_2$-sitoxrom *c* reduktaza (III kompleks) və sitoxrom *c* oksidaza (IV kompleks) daxildirlər (bax Şəkil 12-22).
- Hər bir kompleks bir və ya daha artıq elekron-daşıyan prostetik qruplara – dəmir-kükürd klasterlərinə, flavinlərə, hem qruplarına və mis ionlarına malikdirlər (bax Cədvəl 12-4). Hem və koenzim Q-yə (CoQ) malik olan, lipiddə həll olan kiçik molekul sitoxrom *c* elektronları komplekslər arasında hərəkətə gətirən mobil daşıyıcılardır.
- I, III və IV komplekslər protonları matrisadan membranlararası boşluğa vurur. I və II komplekslər CoQ-ni, protonları və yüksək enerjili elektronları III kompleksə daşıyan $CoQH_2$-ə reduksiya edirlər. Hem zülalı sitoxrom *c* elektronarı III kompleksdən IV kompleksə aparır, və onları protonların vurulması və molekulyar oksigenin suya reduksiya edilməsi üçün istifadə edir.
- Yüksək-enerjili elektronlar NADH-dan I kompleksi keçərək elektron nəqliyyat zəncirinə daxil olurlar, yüksək-enerjili elektronlar $FADH_2$-dən (limon turşusu tsiklində suksinatdan törənmişdir) isə II kompleksdən keçərək elektron nəqliyyat zəncirinə daxil olurlar. Yağ asil CoA β-oksidləşməsinin ilkin mərhələsi ilə $FADH_2$-dən alınan əlavə elektronlar elektron nəqliyyatı üçün mövcud olan $CoQH_2$-nin təchizatını artırır.
- Q tsikli hər bir cüt elektrona görə dörd protonun III kompleksdən keçərək translokasiya olunmasına imkan verir (bax Şəkil 12-24).
- Zəncirdə hər bir elektron daşıyıcısı elektronu və ya elektron cütünü müsbət reduksiya potensialı aşağı olan daşıyıcıdan qəbul edir və müsbət reduksiya potensialı daha çox olan daşıyıcıya ötürür. Beləliklə, elektron daşıyıcılarının reduksiya potensialları biristiqamətli "aşağıya diğru", elektronun NADH və $FADH_2$-dən O_2-ə doğru axınına üstünlük verir (bax Şəkil 12-25).
- Daxili mitoxondri membranında elektron nəqliyyat kompleksləri, xüsusi fosfolipid olan kardiolipinlə bir yerdə saxlanılan superkomplekslərdə toplanırlar. Superkomplekslərin yaranması proton-hərəkətverici qüvvənin yaranmasının sürətini və səmərəliliyini artıra bilir və ya başqa rol oynaya bilir.
- Reaktiv oksigen nümunələri (ROS) elektron nəqliyyat zəncirinin zəhərli əlavə-məhsulları olub zülalları, DNT-ni və lipidləri modifikasiya edərək zədələyə bilirlər. Spesifik fermentlər (məsələn, qlutation peroksidaza, katalaza) və kiçik molekullu antioksidantlar (məsələn, vitamin E) ROS-la-induksiya olunan zədələnməyə qarşı müdafiə olnmaqda kömək edirlər (bax Şəkil 12-27). ROS hüceyrədaxili siqnal molekulları kimi də istifadə oluna bilir.
- NADH-dan O_2-ə axan bir cüt elektrona görə ümumilikdə 10 H^+ ionu matrisadan daxili membrana translokasiya olunur (bax Şəkil 12-22), halbuki $FADH_2$-dən O_2-ə axan hər bir cüt elektrona götə 6 H^+ ionu translokasiya olunur.
- Proton-hərəkətverici qüvvə əsasən daxili membranda proton vurulması ilə yaranan gərginlik qradienti ilə bağlıdır, pH qradienti kəmiyyətcə az əhəmiyyətli rol oynayır.

12.5 Proton-Hərəkətverici Qüvvənin ATP Sintezinə Qoşulması

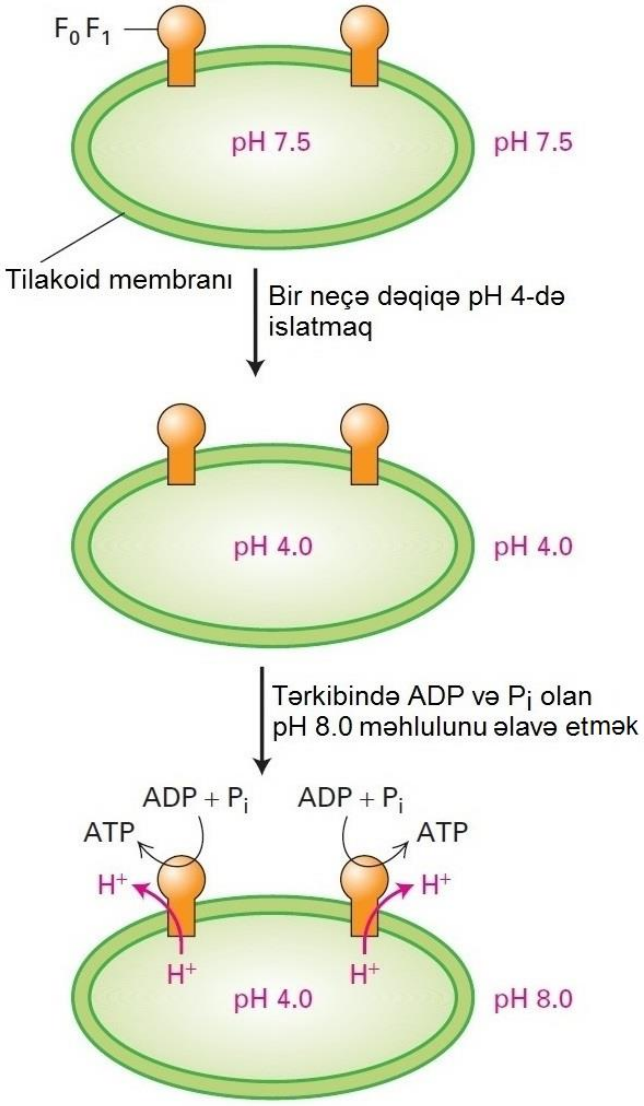
Proton-hərəkətverici qüvvənin daxili mitoxondrial membranda ATP-nin sintez olunmasının birbaşa enerji mənbəyi olması fərziyyəsi 1961-ci ildə Peter Mitchel tərəfindən irəli sürülmüşdür. Oksidativ fosforlaşmanı və fotosintezi öyrənən bütün tədqiqatçılar virtual olaraq ilk əvvəl onun nəzəriyyəsini (*kemoosmotik nəzəriyyəni*) inkar etdilər (qəbul etmədilər). Onlar, o zaman yaxşı məlum olan qlikolizdə substrat-səviyyəsində fosforlaşmaya oxşar olan mexanizmə üstünlük verirdilər, burada substrat molekulunun kimyəvi transformasiyası (qlikoliz zamanı fosfoenolpiruvat) bir başa ATP sintezi ilə bağlanır. Amma, böyük sayda tədqiqatçıların apardıqları gərgin cəhdlərə baxmayaraq, belə substrat-səviyyəsində fosforlaşma-vasitəsi ilə gedən mexanizmin inandırıcı dəlilləri müşahidə olunmadı.

Mitçelin fərziyyəsini dəstəkləyən qəti sübutlar, orqanoid membranlarını və membran zülallarını ayırıb təmizləmək və onları yenidən qurmaq metodlarının işlənilib inkişaf etdirilməsindən asılı idi. Şəkil 12-23-də verilmiş, **ATP sintazaya** malik olan xloroplast tilakoid membranlarından hazırlanmış qovucuqlarla (mitoxondrilərin daxili membranlarına ekvivalent) aparılan eksperimentlər bu zülalın ATP-yaradan ferment olduğunu və ATP-nin əmələ gəlməsinin protonların elektrokimyəvi qradientlə aşağıya doğru hərəkətindən asılı olduğunu göstərən bir sıra eksperimentlərdən birdir. Buradan aşkar olundu ki, protonlar membranı keçərkən onlar ATP sintaza *vasitəsi ilə* hərəkət edirlər.

Bizim görəcəyimiz kimi, ATP zintaza multizülal kompleksdir və $\mathbf{F_0}$ (kompleksin transmembran sahəsinə malik olan hissə) adlanan və $\mathbf{F_1}$ (kompleksin membrandan yuxarı, mitoxondrinin matrisasına istiqamətlənən qlobulyar sahələrinə malik olan hissəsi) adlanan iki subkompleksə bölünür. Beləliklə, çox zaman ATP zintaza F_0F_1 kompleks adlandırılır, biz bu terminləri qarşılıqlı istifadə edəcəyik.

ATP Sintezinin Mexanizmi Bakteriyalarda, Mitoxondrilərdə və Xloroplastlarda Oxşardır

Baxmayaraq ki, bakteriyalar daxili membrana malik deyillər, bununla belə aerob bakteriyalar oksidativ fosforlaşmanı eukaryotların mitoxondrilərində və xloroplastlarında baş verən eyni mexanizmlə aparırlar (Şəkil 12-30). Reaksiyanı həm qlikolitik yolda həm də limon turşusu tsiklində kataliz edən fermentlər bakteriyaların sitozolunda mövcuddurlar; NADH-ı NAD^+-a oksidləşdirən və elektronları sonuncu akseptor O_2-ə keçirən fermentlər bakterial plazma membranında da yerləşirlər. Elektronların bu membran daşıyıcılarından keçərək hərəkət etməsi protonların hüceyrədən kənara vurulması ilə qovuşur. Protonların qatılıq qradientinin azalan istiqamətində geriyə, ATP sintaza ilə hüceyrə daxilinə daşınması ATP sintezini aparır. Bakterial ATP sintaza (F_0F_1 kompleks) mahiyyətcə quruluşuna və fəaliyyətinə görə mitoxondri və xloroplastların ATP sintazası ilə eynidir, amma ayırıb təmizlənməsi və öyrənilməsi çox asandır.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 12-29 ATP sintaza ilə ATP sintezi membranın pH qradientindən asılıdır. ATP sintazaya (F_0F_1 zərrəciklər) malik olan, ayrılmış xloroplast tilakoid qovucuqları qaranlıqda pH 4.0 bufer məhlulunda tarazlaşdırılmışdır. Tilakoid lümenlərində pH 4.0 olduqda qovucuqlar sürətlə tərkibində ADP və Pi olan pH 8.0 məhlulla qarışdırıldı. Kəskin sürətlə başlanan ATP sintezi protonların H^+ 10000-qat qatılıq qradienti (10^{-8}M-a qarşı 10^{-4}M) ilə aparılan transmembran hərəkəti ilə müşayət olundu. Mitoxondri membran qovucuqlarından hazırlanmış "daxildən-xaricə" preparatı ilə aparılan oxşar eksperimentlərdə süni yaradılan membran elektrik potensialı da ATP sintezi ilə nəticələndi.

Nədən ATP sintezi mexanizmini prokariot orqanizmlərlə eukariot orqanoidlər bölüşürlər (arasında oxşardır)? İbtidai aerob bakteriya, yəqin ki, eukariot hüceyrələrdəki həm mitoxondri həm də xloroplastların əcdadıdır (bax Şəkil 12-7). Bu *endosimbiont nəzəriyyə*yə görə daxili mitoxondri membranı bakteryal plazma membranından törəmişdir, onun sitozola baxdığı tərəf mitoxondrinin matrisa boşluğu olmuşdur. Buna oxşar olaraq bitkilərdə əcdadın plazma mebranı xloroplastların tilakoid membranı və onun sitozol üzünün istiqamətləndiyi tərəf xloroplastlardakı stroma boşluğudur (xloroplastın quruluşu 12.6 bölməsində təsvir ediləcək). Bütün hallarda ATP sintaza, ATP sintezini kataliz edən qlobulyar F_1 domeni membranın sitozol üzünə istiqamətlənmiş şəkildə yerləşir, ona görə də, həmişə ATP membranın sitozol tərəfində əmələ gəlir (bax Şəkil 12-30). Protonlar həmişə ATP sintazadan keçərək membranın eqzoplazmatik üzündən sitozol üzünə tərəf axır. Bu axma proton hərəkətverici qüvvəsi tərəfindən aparılır. Həmişə, sitozol üz eqzoplazmatik üzlə nisbətdə mənfi elektrik potensialına malik olur.

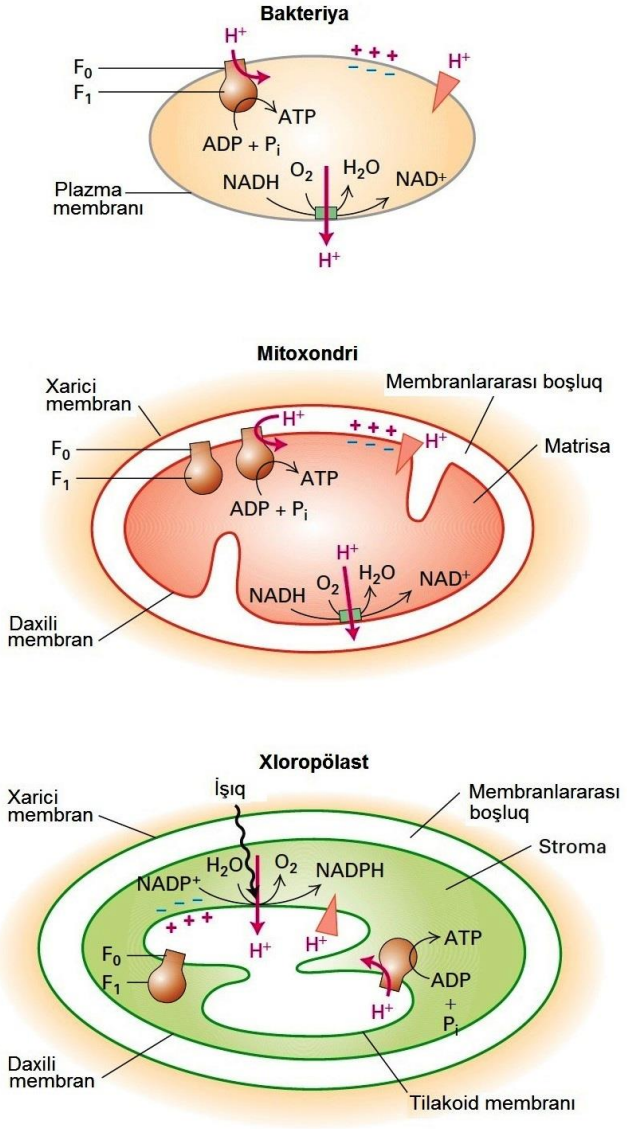
Bakterial plazma membranında proton hərəkətverici qüvvə ATP sintezindən başqa, digər prosesləri də, o cümlədən, şəkər kimi (proton/şəkər simporterlərdən istifadə edərək) qida maddələrinin sorulması, bakteriya qamçılarının (flaqella) fırlanmasını aparmaq üçün istifadə olunur. Beləliklə kemiosmotik cütləşmə Fəsil 11-də bizim fəal daşınma barədə müzakirəmizdə təqdim olunan mühüm prinsipi izah edir: *membran potensialı, protonların (və başqa ionların) membranda qatılıq qradientləri və ATP-də fosfoanhidrid rabitələri kimyəvi potensial enerjinin ekvivalent və bir-birinə çevrilə bilən formalarıdırlar*. Həqiqətən də, ATP sintaza ilə ATP-nin sintezi əksinə istiqamətdə fəal daşınma kimi düşünülə bilər.

ATP Sintaza F_0 və F_1 Multuzülal Komplekslərdən Təşkil Olunmuşdur

Mitchelin xemiosmotik mexanizminin ümumi qəbulundan sonra tədqiqatçılar diqqətlərini ATP sintazanın quruluşuna və fəaliyyətinə yönəltdilər. Bu kompleks iki əsas subkompleksdən, F_0 və F_1 komplekslərdən ibarətdir, bunların hər ikisi multimer zülallardır (Şəkil 12-31a). F_0 komponenti, **a**, **b** və **c** kimi işarələnən üç tip inteqral membran zülallarına malikdir. Bakteriyalarda və maya mitoxondrisində daha çox ümumi olan subvahidlərin stoixiometriyası $\mathbf{a_1b_2c_{10}}$-dur, amma subkomplekslərə görə subvahidlərin sayı müxtəlif eukaryotlarda 8-dən 10-a qədər dəyişilir. Bütün hallarda **c** subvahidlər membran müstəvisində ponçik-formalı halqaları ("c halqalar") əmələ gətirirlər. Bir **a** və iki **b** subvahidi bir-biri ilə möhkəm (sərt) bağlıdırlar, amma **c** halqa ilə bağlı deyillər, bu zülalın kritik əhəmiyyətli xüsusiyyətidir və biz tezliklə buna qayıdacağıq.

F_1 hissə, $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ polipeptidlərdən təşkil olunmuş beş müxtəlif polipeptidin əmələ gətirdiyi suda-həll ola bilən kompleksdir, normal halda membran səthində F_0 subkompleksi ilə möhkəm şəkildə birləşir. F_1 subkompleksinin çöp-şəkilli γ subvahidinin aşağı ucu spirallaşmış spiraldır və F_0-ın **c**-subvahid halqasının mərkəzinə uyğun gəlir, sanki sərt şıkildə ona birləşmişdir. Beləliklə, **c**-subvahid halqası fırlanarkən çöp-şəkilli **γ** subvahid onunla hərəkət edir. F_1 **ε** subvahidi sərt şəkildə **γ** subvahidə birləşir və eyni zamanda, F_0-ın **c** subvahidlərindən bir neçəsi ilə sıx əlaqə yaradır. α və β subvahidlər, F_0 subkompleksinin ümumi qlobulyar quruluşunu yaradırlar və alternativ ardıcıllıqla birləşərək (assosasiya edərək) αβαβαβ, və ya $(\alpha\beta)_3$ heksameri əmələ gətirirlər və tək uzun γ subvahidin yuxarısında dururlar. F_1 **δ** subvahid F_1 α subvahidlərdən biri ilə həmişəlik birləşmişdir, həmçinin F_0-ın **b** subvahidinə də birtləşmişdir. Beləliklə, F_0 subkompleksinin **a** və **b** subvahidləri, həmçinin **δ** subvahid və F_1 kompleksinin $(\alpha\beta)_3$ heksameri membrana lövbər edən sərt quruluşu əmələ gətirirlər. Çöpşəkilli **b** subvahid "stator" rolunu oynayır və $(\alpha\beta)_3$ heksamerin **γ**

subvahidi üstündə duran zaman hərəkət etməsinə mane olur, γ subvahid isə F_0-ın **c** subvahidi ilə birlikdə fırlanmaqla aşağıda təsvir olunan ATP sintezi mexanizmində çox əhəmiyyətli rol oynayır.



ŞƏKİL 12-30 Kemiosmozislə ATP sintezi bakteriyalarda, mitoxondrilərdə və xloroplastlarda oxşardır. Kemiosmozisdə membrandan proton vurulması ilə yaranan proton-hərəkətverici qüvvəsi ATP sintezini təmin etmək üçün istifadə olunur. Prosesin mexanizmi və membranda istiqamətlənməsi bakteriyalarda, mitoxondrilərdə və xloroplastlarda oxşardır. Hər bir təsvirdə kölgələnmiş tərəfə baxan membran səthi sitozol üzüdür; membranın kölgələnmiş olmayan ağ tərəfə baxan səthi eqzoplazmatik üzdür. Qeyd etmək lazımdır ki, bakterial plazma membranının sitozol üzü, daxili mitoxondri membranının matrisa üzü və tilakoid membranının stroma üzü hamısı ekvivalentdir. Elektron daşınması zamanı protonlar həmişə sitozol üzündən eqzoplazmatik üzə tərəf vurulur, membranda proton qatılıq qradientini (eqzoplazmatik üz > sitozol üz) və elektrik potensialını (sitozol üzü mənfi eqzoplazmatik üz müsbət) yaradır. ATP sintezi zamanı protonlar əks istiqamətdə (elektrokimyəvi qradientlərinin azalan istiqamətində), bütün hallarda cytosol üzündə çıxıntı şəkilində qabarıb çıxan ATP sintazadan (F_0F_1 kompleksindən) keçərək axırlar.

ATP sintaza membrana batan (yüklənən) zaman F_1 komponent sitozol üzündən (bu mitoxondridə matrisadır) dik uzanaraq çıxıntı əmələ gətirir. Membrandan təcrid olunmuş F_1 ATP hidroliz etmək (ATP-nin ADP və P_i çevrilməsi) qabliyyətinə malik olduğundan, o, F_0 komponenti olmadıqda F_1 ATP-aza adlandırılır, amma onun hüceyrələrdə ATP sintez etmək üçün fəaliyyəti "əksinədir". ATP hidrolizi spontan prosesdir ($\Delta G < 0$), beləliklə "əks" istiqamətdə ATP-azanın işləməsi və ATP yaratması üçün enerji tələb olunur.

F_1 γ subvahidin Fırlanması, Protonların F_0-la Hərəkətinin İdarə Olunması ATP Sintezini Gücləndirir

F_0F_1 kompleksin qlobulyar F_1 hissəsinin üç β subvahidinin hər biri, protonların eqzoplazmatik mühitdən (mitoxondridə membranlararası boşluqdan) sitozol (matrisa) mühitinə axmasına qoşulan zaman ADP və P_i ilə birləşə və ATP-nin enderqonik sintezini kataliz edə bilir. Amma, proton axınının energetik qovuşması və ATP sintezi zülalın eyni hissələrində baş vermir, çünki F_1-in β subvahidləri üzərində ATP sintezinin baş verdiyi nukleotid-birləşdirən mərkəzlər (saytlar) mitoxondrial membran daxilinə batmış F_0-da membran səthindən 9-10 nm-lik məsafədə protonların axdığı hissəsindədir. F_0F_1 kompleksle ATP sintezinin çox geniş qəbul olunan modeli — *birləşmənin-dəyişməsi mexanizm* — dolayı əlaqəni yaradır (Şəkil 12-32).

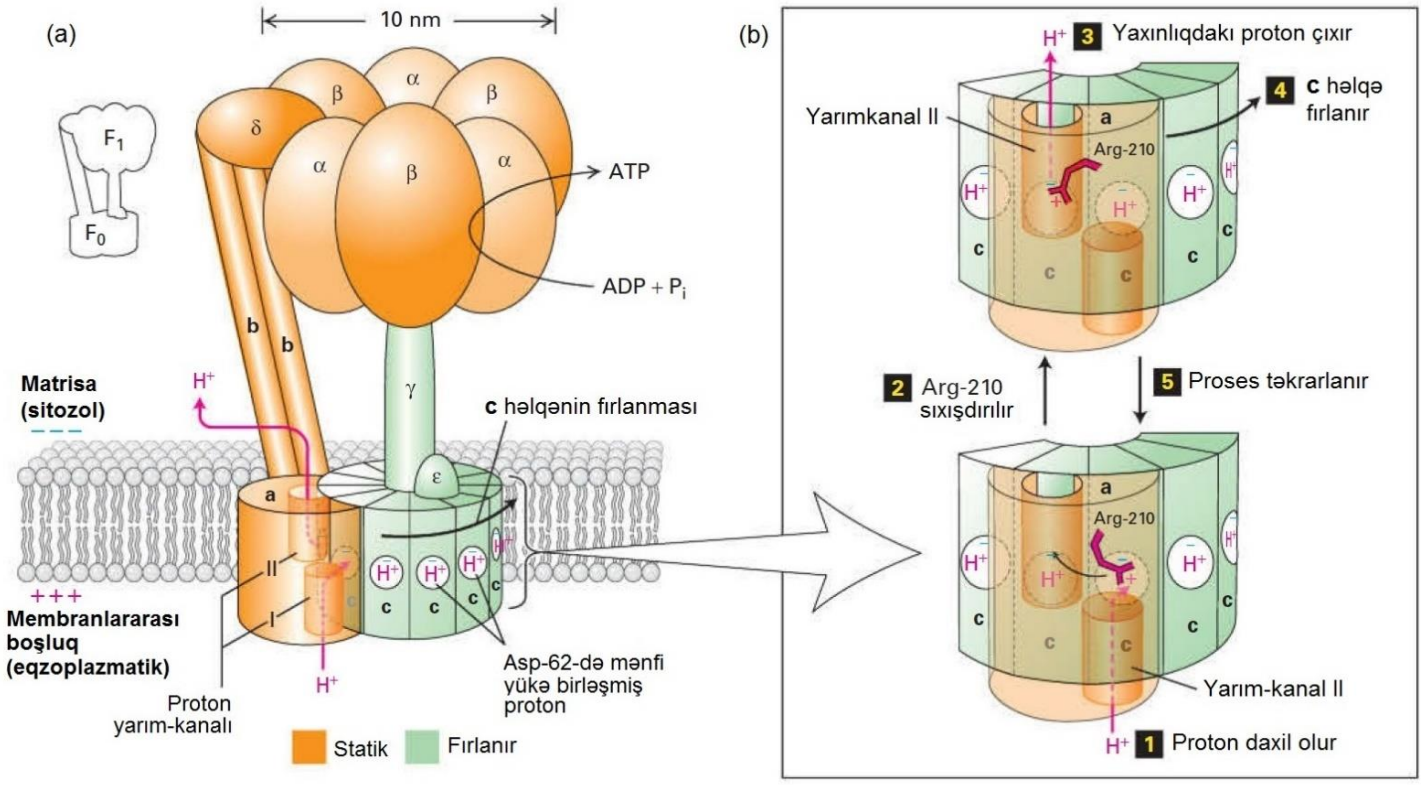
Bu mexanizmə görə protonların F_0 vasitəsi ilə "aşağıya" hərəkətindən ayrılan enerji birbaşa **c**-subvahidi halqalarının ona birləşmiş γ və ε subvahidlərlə birlikdə fırlanmasını təmin dir (bax Şəkil 12-31a). Burada γ subvahidi sanki bir yumruq kimi və ya qeyri simmetrik fırlanan mil kimi fəaliyyət göstərir, F_1-in statik heksamerinin $(\alpha\beta)_3$ mərkəzi daxilində **c** halqa ilə idarə olunan fırlanma onun ardıcıl olaraq hər bir β subvahidin əksinə qarşı itələnməsinə səbəb olur və beləliklə, onların konformasiyalarında üç müxtəlif vəziyyət arasında tsiklik dəyişilmələri əmələ gətirir. Şəkil 12-32-də $(\alpha\beta)_3$ heksamerin qlobulyar quruluşunun altdan görünüşündə sxematik göstərildiyi kimi, γ subvahidin $(\alpha\beta)_3$ heksamerə nisbətdə fırlanması hər bir β subvahidin nukleotid-birləşdirən mərkəzinin aşağıdakı ardıcıllıqda üç konformasiya statusundakı dövrəsinə səbəb olur:

1. ATP-nin çox az, ADP və P_i ilə zəif birləşdiyi O (açıq – open) vəziyyəti;

2. ADP və P_i ilə möhkəm birləşmiş, amma ATP ilə birləşə bilməyən L (boş – loose) vəziyyəti;

3. ADP və P_i ilə sıx birləşmiş, onların spontan şəkildə reaksiyay girərək ATP əmələ gətirdiyi T (sıx) vəziyyəti.

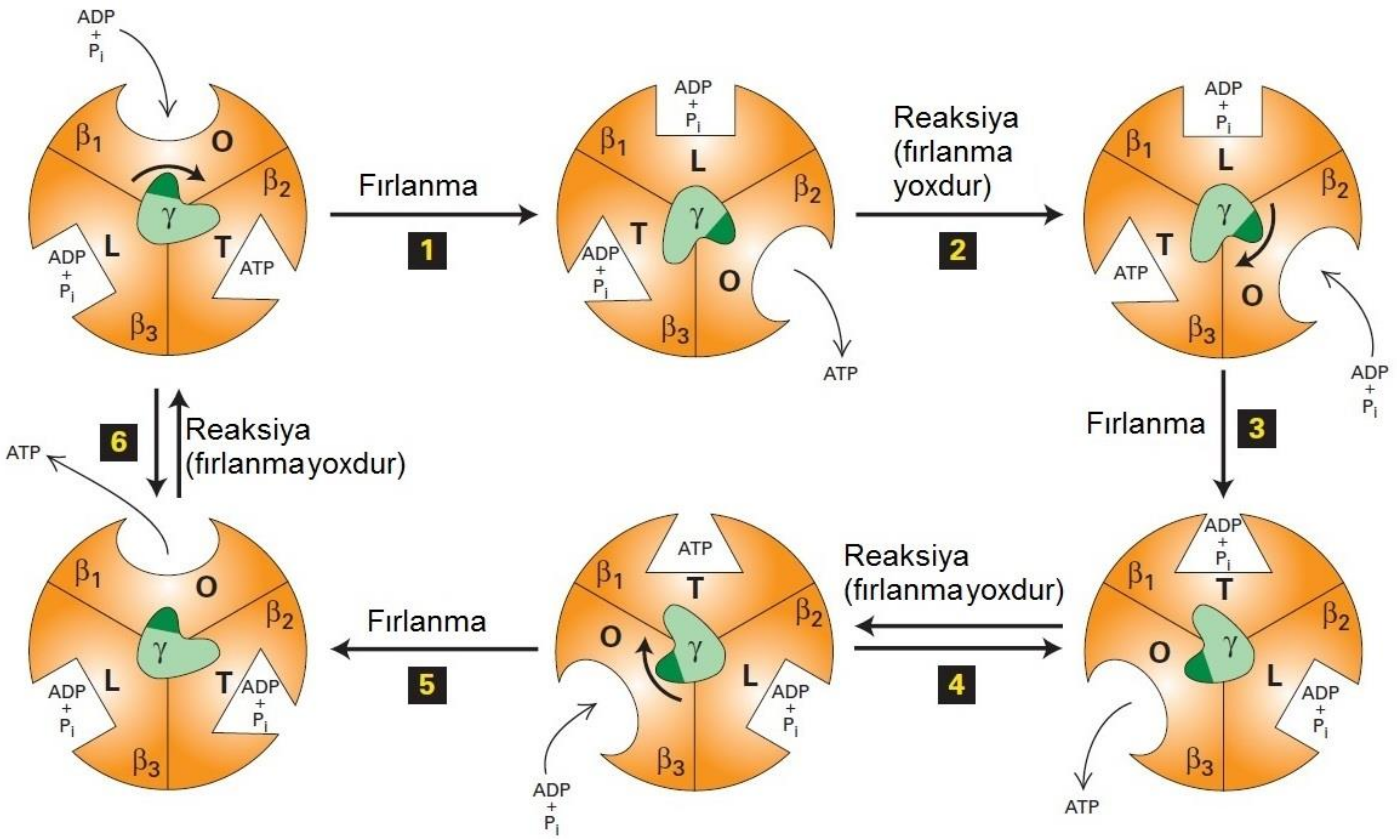
T vəziyyətində istehsal olunan ATP elə möhkəm birləşir ki, o mərkəzdən asanlıqla dissosasiya edə bilmir—γ subvahidin başqa bir dövrəsinin β subvahidi O vəziyyətinə qaytarmasına qədər tələyə düşmüş vəziyyətdə qalır, beləliklə, ATP-ni buraxır və tsikli (dövrəni) yenidən başlayır. ATP və ya ADP həmçinin üç α subvahidlərində tənzimləyici və ya allosterik saytlara birləşir, bu birləşmə matrisada ATP və ya ADP-nin səviyyəsindən asılı olaraq ATP sintezinin sürətini modifikasiya edir, amma ADP və P_i-dan ATP-nin sintezində birbaşa iştirak etmir.



ŞƏKİL 12-31 Bakteriyanın plazma membranında ATP sintazanın (F_0F_1 kompleksin) quruluşu və membranda proton translokasiyasının mexanizmi. (a) ATP sintazanın membrana batmış F_0 hissəsi üç inteqral membran zülallarından qurulmuşdur: bir nüxsə **a**, iki nüxsə **b** və orta hesabla on nüxsə **c** membran müstəvisində halqa şəkilində düzülmüşlər. **a** subvahidi araüzündə iki proton yarım-kanalı protonların membranda hərəkətini (qırmızı oxlarla göstərilmiş proton yolu) həyata keçirir. Yarım-kanal I protonların hər dəfə biri olmaqla eqzoplazmatik mühitdən membranın ortasına yaxın **c** subvahidinin mərkəzində mənfi yüklənmiş Asp-61-in yan zəncirinə keçməsinə imkan verir. Hər bir **c** subvahidində proton-birləşdirən sayt Asp-61-in yan zəncirlərinin mənfi yükünü təmsil edən mavi "—" işarə ilə birlikdə ağ dairələrlə təqdim olunmuşdur. Yarım-kanal II protonların yaxındakı **c** subvahidində Asp-61-dən sitozol mühitə keçməsinə imkan verir. **c** halqanın **a** subvahidinin ona bitişik hissəsinin quruluşunun detalları Şəkil 12-34-də göstərilmişdir. ATP sintazanın F_1 subkompleksi α və β subvahidlərinin hər birinin üç nüxsəsinə malikdir, bunlar F_0-ın **c** halqasına girən çöp-şəkilli tək γ subvahidin yuxarısında sakit duran heksameri əmələ gətirirlər. **ε** subvahid sərt şəkildə **γ** subvahidə və **c** subvahidlərdən bir neçəsinə birləşmişdir. δ subvahid F_1 kompleksində α subvahidlərdən birini daimi olaraq F_0-da olan **b** subvahidi ilə bağlayır. Beləliklə F_0 **a** və **b** subvahidləri, F_1 δ subvahidi və $(\alpha\beta)_3$ heksameri membrana lövbər salan sərt quruluşu əmələ gətirirlər (narıncı). Proton axını zamanı, **c** halqa və ona qoşulmuş F_1 ε və γ subvahidlər bir vahid kimi (yaşıl) fırlanırlar, F_1 β subvahidlərində konformasiya dəyişikliyinə səbəb olur və ATP sintezini həyata keçirirlər. (b) Proton translokasiyasının potensial mexanizmi. Pillə 1: Proton eqzoplazmatik boşluqdan yarım-kanal I-ə daxil olur və "boş" (protonlaşmamış) Asp-61 proton birləşdirən mərkəzə doğru hərəkət edir. Asp-61-in protonlaşmamış yan zəncirindəki mənfi yük (mavi "—") Arg-210-un yan zəncirindəki müsbət yüklə (qırmızı "+") qismən tarazlaşır. Pillə 2: proton boş proton-birləşdirən saytı doldurur və eyni zamanda, yaxınlıqdakı **c** subvahidin dolmuş proton-birləşdirən mərkəzi üzərində asılan Arg-210-un yan zəncirini sıxışdırıb çıxarır. Nəticədə yaxınlıqdakı mərkəzə (sayta) birləşmiş proton sıxışdırılaraq çıxarılır. Pillə 3: Çıxarılmış yaxınlıqdakı proton yarım-kanal II ilə hərəkət edir və sitozol boşluğuna buraxılır, Asp-61-dəki proton birləşdirən mərkəz (sayt) boş qalır. Pillə 4: Tam **c** halqanın saat əqrəbinin əksi istiqamətində fırlanması "boş" **c** subvahidini yarım-kanal I-in üstünə gətirir. Pillə 5: Proses təkrarlanır. Bax M.J. Schintzer, 2001, *Nature* **410**:878; P.D. Boyer, 1999, *Nature* **402**:247; və C. von Ballmoos, A. Wiedenmann, and P.Dimroth, 2009, *Ann.Rev.Biochem.* **78**:649-672.

Bu tipli bir sıra müxtəlif sübutlar birləşmə-dəyişilməsi mexanizmini təsdiqləyir. Birincisi, biokimyəvi tədqiqatlar göstərdi ki, ayrılmış F_1 zərrəcikdə üç β subvahiddən biri ADP və Pi ilə sıx şəkildə birləşir və sonra da ona sıx şəkildə birləşmiş vəziyyətdə olan ATP-ni əmələ gətirir. Bu reaksiya üçün ölçülən ΔG sıfıra yaxındır, bu göstərir ki, ADP və P_i β subvahidin T vəziyyətinə birləşdikdən sonra onlar spontan şəkildə ATP-ni əmələ gətirirlər. Əhəmiyyətlidir ki, birləşmiş ATP-nin ayrılmış F_1 zərrəciklərdə β subvahiddən dissosasiya etməsi həddən artıq zəif baş veir. Bu kəşflər göstərir ki, ATP-nin dissosasiyası β subvahidində konformasiya dəyişikliyi ilə təmin olunmalıdır, bu da öz növbəsində proton keçməsinin səbəb olduğu **c** halqanın fırlanması nəticəsində baş verməlidir.

$(\alpha\beta)_3$ heksamerin rentgen kristalloqrafiya analizləri diqqət çəkən nəticəni aşkar etdi: baxmayaraq ki, üç β subvahid ardıcıllığına görə və ümumi quruluşlarına görə identikdirlər, ADP/ATP birləşdirən mərkəzlər hər bir subvahiddə fərqli konformasiyaya malikdir. Ən inandırıcı nəticə üç β subvahidin, nukleotid-birləşdirən saytlarının kifayət qədər fərqli konformasiyalara malik olduqları üç konformasiya vəziyyətləri (O, L, T) arasında enerjidən-asılı olan reaksiya ilə fırlanmasıdır.



ŞƏKIL 12-32 ADP və P_i-dan ATP sintezinin birləşmə-dəyişilməsi mexanizmi. Bu görünüş F_1-ə yuxarıdan, membran səthindən baxdıqda görünür (bax Şəkil 12-31). γ subvahid mərkəzdə 120° fırlanan kimi, identik F_1 β subvahidlərin hər biri üç konformasiya vəziyyəti arasında dəyişir (**O**, açıq birləşmə saytının oval təsviri; **L**, zəif düzbucaqlı birləşmə saytı; **T**, sıx üçbucaqlı birləşmə saytı), bunlar ATP, ADP və P_i üçün birləşmə afinliyinə görə fərqlənirlər. Dövrə (*yuxarı sol*) ADP və P_i zəif şəkildə, nukleotid-birləşdirən saytın O (açıq) vəziyyətində olan üç β subvahidin birinə (burada özbaşına təyin edilən β_1) birləşəndə başlanır. Zülalın F_0 hissəsi ilə proton axını γ subvahidin (fiksə olunmuş β subvahidə nisbətən) 120° fırlanmasını təmin edir (pillə 1). Bu assimetrik, fırlanan γ subvahidin differensial olaraq β subvahidi əks tərəfə itələnməsinə səbəb olur və bunun nəticəsində konformasiya dəyişikliyi və β_1 subvahidin ADP və P_i-ı birləşdirmək üçün afinliyinin artmasına (O-dan → L-ə), β_3 subvahidin əvvəlcədən birləşmiş ADP və P_i-u birləşdirmək üçün afinliyinin artmasına (L-dan → T-ə), və β_2 subvahidin əvvəlcədən birləşmiş ATP-yə birləşdirmə afinliyinin artmasına (T-dan → O-a), birləşmiş ATP-nin buraxılmasına (azad olmasına) səbəb olur. Pillə 2: Əlavə fırlanma olmadan, T saytında (burada β_3 subvahid) ADP və P_i-dan ATP-ni əmələ gətirir, bu reaksiya T vəziyyətin fəal mərkəində xüsusi mühitin olmasına görə əlavə enerjinin daxil olunmasını tələb etmir. Eyni zamanda, yeni ADP və Pi β_2-də tutulmamış O saytına zəif birləşir. Pillə 3: Proton axını γ subvahidin digər 120° fırlanmasını, ardınca gələn birləşmə saytlarındakı (L→T, O→L, T→O) konformasiuya dəyişilmələrini və ATP-nin β_3-dən buraxılmasını həyata keçirir. Pillə 4: Əlavə fırlanma olmadan, β_1–in T saytında ADP və P_i birləşərək ATP-ni əmələ gətirir və əlavə ADP və Pi β_3–də tutulmamış O mərkəzə birləşir. Proses fırlanma ilə (pillə 5) və ATP-nin əmələ gəlməsi (pillə 6) ilə dövrə tamamlanana qədər davam edir, γ subvahidin hər bir 360° dövrəsində üç ATP istehsal olunur. Bax P. Boyer, 1989, *FASEB J.* **3**:2164; Y. Zhou et al., 1997, *Proc.Natl.Acad.USA* **94**:10583; və M. Yoshida, E. Muneyuki and T. Hisabori, 2001, *Nat.Rev.Cell Biol.* **2**:669-677.

Başqa tədqiqatlarda, intakt F_0F_1 komplekslər, γ və ε sibvahidlərlə və **c** subvahidin halqasi ilə kovalent bağlı oan çarpaz-bağlanma reagentləri ilə işlənilmişdir. Belə işlənilmiş komplekslərin ATP sintez edə bilməsi və ya proton vurulmasını təmin etmək üçün ATP hidrolizindən istifadə etməsi üzrə aparılan müşahidələr aşkar etdi ki, çarpaz bağlanan zülallar normal halda birlikdə fırlanırlar.

Nəhayət, γ subvahidin sabit $(\alpha\beta)_3$ heksamerə nisbətən fırlanması, birləşmə-dəyişilməsi mexanizmində təklif edildiyi kimi, Şəkil 12-33-də göstərilən dəqiq eksperimentlədə birbaşa müşahidə edilmişdir. Bu eksperimentlərin, γ subvahidə aktin filament əvəzinə çox kiçik qızıl zərrəciklərin birləşdirildiyi bir modifikasiyasında fırlanma dərəcəsi bir saniyədə 134 dövr olmuşdur. Xatırladığınız kimi, eyni fermentlə kataliz olunan əks reaksiya, üç ATP-nin hidrolizi, guman edilir ki, bir dövrəni gücləndirir, bu nəticələr F_0F_1 komplekslərlə ATP hidrolizinin eksperimental yolla təyin edilmiş sürətinə çox yaxındır: bu bir saniyədə təxminən 400 ATP edir. Oxşar eksperimentlərdə, ε subvahidlə və **c** subvahidlərin halqası ilə əlaqəli olan γ subvahid, görünür müəyyən edilmiş $(\alpha\beta)_3$ heksamerə nisbətən fırlanır. Bu eksperimentlərdə γ subvahidin fırlanması ATP hidrolizi ilə təmin olunur. Bu müşahidələr müəyyən etdi ki, γ subvahid ona qoşulmuş **c** həlqə və **ε** subvahidlə birlikdə həqiqətən də fırlanır və bununla da β subvahidlərdə, ADP və Pi birləşməsi və ardınca da ATP-nin sintezi və azad olması üçün tələb olunan konformasiya dəyişikliyini həyata keçirir.

Bir ATP-ni Sintez Etmək üçün ATP Sintazadan Çoxsaylı Protonlar Keçməlidir

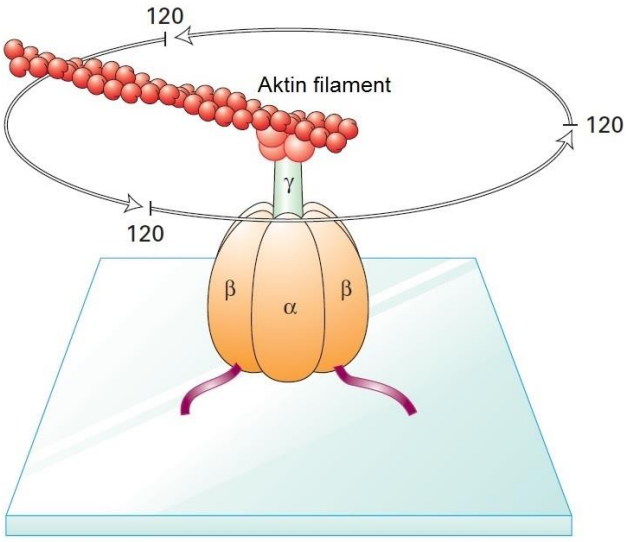
Sadə hesablama göstərir ki, ADP və P_i-dan bir molekul ATP-nin sintez olunması birdən artıq protonun keçməsini tələb edir. Hərçənd ki, bu reaksiya üçün ΔG standart şəraitdə +7.3 kkal/mol-dur, amma mitoxondridə reaksiyaya girən maddələrin qatılığında çox guman ki, ΔG daha yüksəkdir (+10-dan +12 qədər). Biz, bir mol protonun 220 mV (0.22 V) elektrokimyəvi qradientinin azalan istiqamətində keçməsindən ayrılan sərbəst enerjinin miqdarını Nernest tənliyiniə görə n = 1 qoymaqla və ΔE-ni voltla ölçməklə hesablaya bilərik:

$$\Delta G(\text{kal/mol}) = -nF\Delta E = -(23062 \text{ kal} \cdot V^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})\,\Delta E$$

$$= (23062 \text{ kal} \cdot V^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})(0.22 \text{ V})$$

$$= -5074 \text{ kal/mol, və ya } -5.1 \text{ kkal/mol}$$

1 mol protonun aşağıya döğru hərəkətindən cəmisi 5 kkal sərbəst enerji ayırıldığından hər bir ATP molekulunun ADP və P_i-dan sintezi ən azı iki protonun keçməsini tələb edir.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 12-33 F_1 kompleksinin γ subvahidi $(\alpha\beta)_3$ hexamerə nisbətən fırlanır. F_1 kompleks əlavə His-6 ardıcıllığı olan β subvahidə malik olmaqla yaradılmışdır, bu da ona polihistidin birləşən metal reagentlərlə örtülmüş şüşə qaba (lövhəyə) yapışmağa imkan verir. Yaradılmış F_1 kompleksin γ subvahidi fluoressent nişanlanmış aktin filamentə kovalent bağlanmışdır. Fluoressensiya mikroskopunda baxdıqda görünür ki, aktin filamentlər ATP nin iştirakı zamanı, β subvahidlər vasitəsilə ATP-nin hidrolizinə görə 120° diskret pillələrlə (mərhələlərlə) saat əqrəbinin əksi istiqamətdə fırlanır. Bax H. Noji et al., 1997, *Nature* **386**:299; və R. Yasuda et al., 1998, *Cell* **93**:1117 .

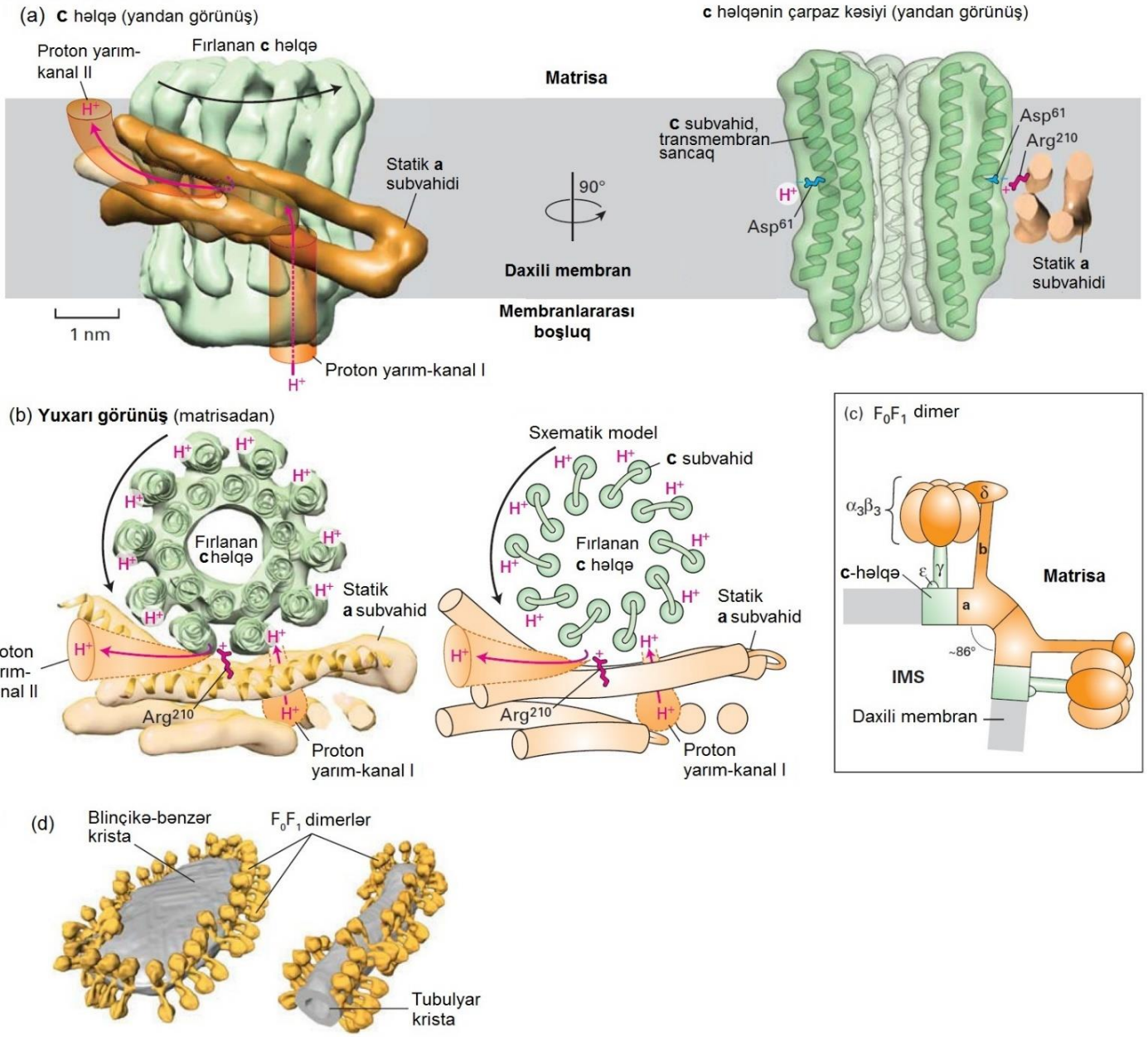
F_0 c Həlqənin Fırlanması Transmembran Kanallardan Axan Protonlarla Idarə Olunur

c subvahidinin hər bir nüsxəsi saç sancağı quruluşunu əmələ gətirən, membrana-sarınan iki α spirala malikdir. Guman olunur ki, hər bir subvahidin spirallarından birinin ortasındakı aspartat qalığı, Asp-61 (*E. coli* ATPaza nömrələnməsinə görə), protonlar membrandan keçərkən onlara birləşmək və buraxmaqla protonların hərəkətində həlledici rol oynayırlar. Bu aspartatın ditsikloheksilkarbodiimid zəhəri ilə kimyəvi modifikasiyası və ya alaninə mutasiya olunması protonların F_0-la hərəkətini xüsusi olaraq blok edir (dayandırır). Hazırda mövcud olan bir modelə görə, protonlar membranı ləngərlənən iki proton-yarımkanalları, I və II ilə keçirlər (bax Şəkil 12-31a və b). Onlar ona görə *yarım-kanal* adlandırılır ki, hər biri membranda yalnız yarı yol uzanır; kanalların membranlararası ucları membranın ortasında Asp-61 səviyyəsində durur. Yarım-kanal I yalnız eqzoplazmatik səthə açılır, yarım-kanal II isə yalnız sitozol üzə açılır. Fırlanmadan öncə, yarım-kanal I ilə əlaqədə olan **c** subvahidində olan istisna olmaqla, qalan bütün başqa **c** subvahidlərində olan hər bir Asp-61 karboksil yan zəncirləri protonlarla birləşirlər. Protonlaşmamış karboksillərdəki ("boş" proton-birləşdirən sayt, bax Şəkil 12-31b, *aşağıda*) mənfi yük **a** subvahidindəki Arg-210-un müsbət yüklənmiş yan zənciri ilə əlaqəyə girərək neytrallaşır. Membranda proton translokasiyası protonlar eqzoplazmatik mühitdən yarım-kanal I vasitəsi ilə yuxarıya doğru hərəkət edəndə başlayır (Şəkil 12-31b, pillə 1). Bu proton proton-birləşdirən boş sayta girən kimi, Arg-210-un yan zəncirinin yerini yarım-kanal II ilə əlaqədə olan yaxındakı **c** subvahidin dolmuş proton-birləşdirən saytına tərəf dəyişir (pillə 2). Bunun nəticəsində, Arg-210-un müsbət yan zənciri yaxınlıqdakı **c** subvahidin Asp-61-nə birləşmiş protonu sıxışdırıb çıxarır. Sıxışdırılıb çıxarılmış bu proton indi yarım-kanal II ilə gedərək sitozol mühitinə çıxmaq üşün sərbəstdir (pillə 3). Beləliklə, bir proton yarım-kanal I-dən **c** həlqəyə daxil olanda başqa bir proton membranın əks tərəfində yarım-kanal II vasitəsi ilə buraxılır. Sonra, termal/Broun hərəkətinə görə, bütün **c** həlqənin fırlanması (pillə 4) yeni protonsuzlaşmış **c** subvahidin yarım-kanal I üzərində düzlənməsinə imkan verir və yaxınlıqdakı protonlaşmış **c** subvahidi fırlanaraq yarım-kanal II altında onun yerini tutur. Sonra, əlavə protonlar eqzoplazmatik mühitdən sitozol mühitinə elektrokimyəvi qradientin azalması istiqamətində aşağıya kərəkət etdikcə tam dövrə təkrar olunur (pillə 5). Hər bir parsial fırlanma müddətində (360º həlqədəki **c** subvahidlərin sayına bölünür) **c** həlqənin fırlanması elə bölünür ki, həlqənin xalis hərəkəti yalnız bir istiqamətdə baş verir. Protonların membranda hərəkətini və beləliklə də **c** həlqənin fırlanmasını idarə edən enerji membrandan keçən elektrik potensialından və pH qradientindən gəlir. Əgər proton axınının istiqaməti geriyə qaytarılarsa, hansıki bunu eksperimental olaraq proton qradientinin və proton-hərəkətverici qüvvənin istiqamətini geriyə dəyişməklə etmək mümkündür, o zaman **c** həlqənin fırlanma istiqaməti də dəyişəcək.

F_1-in γ subvahidi F_0-ın **c** həlqəsinə möhkəm birləşdiyindən **c** həlqənin proton hərəkəti ilə bağlı olan fırlanması γ subvahidinin fırlanmasına səbəb olur. Birləşmə-dəyişilməsi mexanizminə görə γ-nın 120° fırlanması bir ATP-nin sintezinə səbəb olur (bax Şəkil 12-32). Beləliklə, **c** həlqəsinin 360° tam fırlanması üç ATP-ni əmələ gətirə bilir. F_0 tərkibi $a_1b_2c_{10}$-dan ibarət olan *E. coli*-də 10 protonun keçməsi tam bir dövrənin baş verməsinə və beləliklə üç ATP sintezinə səbəb olur. Bu kəmiyyət ATP sintezi zamanı proton axınından alınan eksperimental nəticələrlə tam uzlaşır, proton hərəkətini Şəkil 12-31-də verilmiş **c**-həlqəsinin fırlanması ilə bağlayan modeli dolayı yolla dəstəkləyir. Xloroplastlarda F_0 hər həlqədə 14 **c** subvahidinə malikdir və üç ATP-nin sintezi üçün 14 zülalın hərəkəti lazımdır. Başqa halda oxşar olan bu F_0F_1

kompleksləri̇nin, nəyə görə fərqli H^+:ATP nisbətinə malik olmaqla yarandıqları, hələ məlum deyil.

Yüksək rezolyusiyalı elektron mikroskopiya tomoqrafiyası (Şəkil 12-34) **c** halqa/**a** subvahid araüzünün quruluşunda yeni bilikləri təmin etdi və F_0F_1-in quruluşunda və funksiyasında digər xüsusiyyətləri aşkar etdi. Eksperimentlər ya detergentlə həll edilərək təmizlənmiş F_0F_1-in süni fosfolipid ikiqatlısına, ya da ayırılmış mitoxondri membranlarına inkorporasiyasından istifadə etməklə aparıldı. Şəkil 12-34a və b, **c** subvahidinin (yaşıl) hər birində iki membrana sarınmış α spiralın iki görünüşünü göstərir, bunlar birlikdə **c** halqanı əmələ gətirirlər. **a** subvahidi hissəsində (narıncı) təxminən daxili mitoxondri membranına parallel olan və ona batmış dörd α spiral bağı (bundle) **c** halqa ilə araüzü əmələ gətirir və Arg-210-un yan zəncirini c halqaya elə yaxın yerləşdirir ki, Şəkil 12-31-də göstərildiyi kimi, protonun Asp-61-dən sıxışdırılıb çıxarılmasını həyata keçirə bilsin. **c** halqa/**a** subvahid araüzü həmçinin iki proton yarımkanalını əmələ gətirir, bunlarla protonlar membranlararası boşluqdan xaricə axır (qırmızı oxlar), əvvəlcə **c** halqa ətrafında (Şəkil 12-34b-də qara oxlar), sonra isə mitoxondridən kənara (qırmızı oxlar) axır. Hər bir F_0F_1 monomer membranı təxminən 43° əyir (Şəkil 12-34). Membrana yüksək dərəcədə əyrilik (~86° qövs) vermək üçün monomerlər dimerləşirlər, sonra isə uzun sıralarda düzlənirlər, blinçikəbənzər (yastı) və boruvari kristaların kənarlarının və uclarının formalaşmasına kömək edirlər (Şəkil 12-34d).

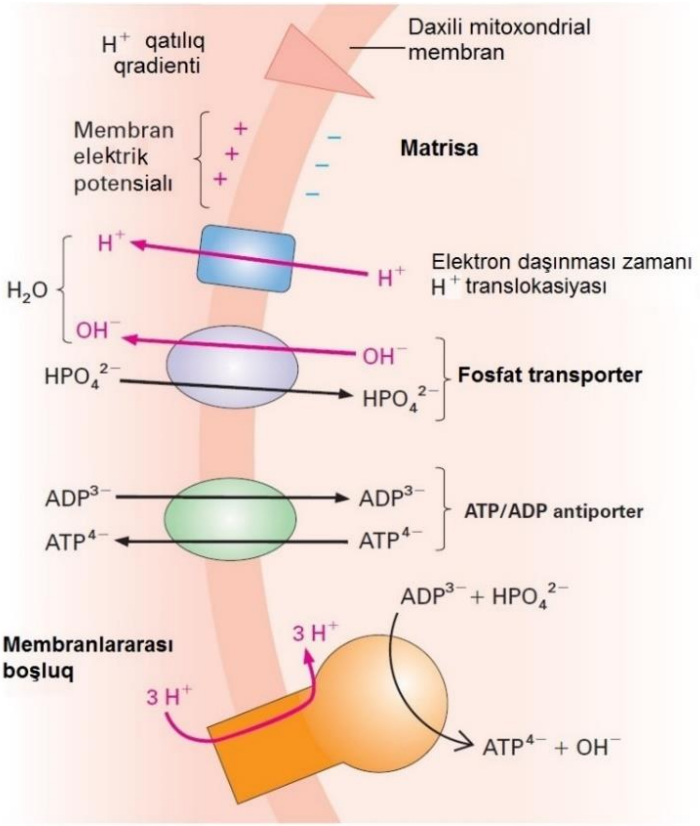


EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 12-34 Proton translokasiyasının yüksək-rezolyusiyalı elektron mikroskopiyaya əsaslanan mexanizmi və krista membranlarının ATP sintaza vasitəsilə əyilməsi. (a) və (b) *Polytomella sp* yosununda detergentlə həll edilən mitoxondrial ATP sintazanın **c** həlqəsi (yaşıl) ilə **a** subvahidi (narıncı) arasındakı araüzünün tək-zərrəcikli elektron mikroskopunda (~0.62 nm rezolyusiyada) alınmış təsvirində göstərilir: (a) daxili mitoxondrial membranın müstəvisi daxilində (yandan görünüş), (b) 90° fırlatdıqdan sonra (yuxarıdan görünüş). Yarım-kanal I və II ilə protonların hərəkəti və **c** halqanın fırlanması Şəkil 12-31-də ətraflı təsvir edilmişdir. (a) **c** halqadan keçən çarpaz kəsik (sağda) göstərir ki, hər bir **c** subvahidin transmembran spiralı sancaq quruluşundadır – iki yaxın transmembran α spiral membranın matrisa tərəfində qısa qeyri spiral linkerlə birləşmişdir. Guman edilir ki, **c** subvahidinin Asp-61 qalığının mənfi yan zənciri membranın ortasında həm translokasiya edən protonlar üçün birləşmə saytı rolunu oynayır, həm də **a** subvahidinin Arg210 qalığının yan zənciri ilə əlaqə yaradır. (c) Öküzün ürəyinin mitoxondrial ATP sintazasının modeli krioelektron tomoqrafiyaya və süni membranlarda ATP sintazanın kristalının elektron kristalloqrafiya təsviri prosessinqinə əsaslanmışdır. Hər bir F_0F_1 monomer membranı membranlararası boşluğa (IMS) tərəf ~43° əyir, nəticədə dimer halda ~86° əyirlər. Fırlanan **c** halqa və γ və ε subvahidlər yaşıl rənglənmişlər, fermentlərin qalan statik hissələri isə narıncı rəngdə göstərilir. (d) *Saccharomyces cerevisiae* (maya) mitoxondrisindən təmizlənmiş membranın krioelektron tomoqrafiyası. ATP sintaza kompleksinin səthləri (narıncı) və membran (boz) göstərir ki, fermentlər (c)-də olduğu kimi dimerləşirlər və membranı xarakterik boruvari, yastı və blinçik-formalı kristalarda əyən uzun sıralarda düzlənirlər. [(a) və (b) hissələri Macmillan Publishers Ltd., razılığı ilə Allegretti, M., et al., "Horizontal membrane-intrinsic α-helices in the stator a-subunit of an F-type ATP synthase," *Nature*, 2015, 521, pp 237-240, 2015-dən yenidən çap olunur; razılıq Copyright Clearance Center, Inc tərəfindən verilmişdir. (c) hissəsi verilənlər C. Jiko et al., 2015, *eLife* **4**:e06119. (d) hissəsi *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012. **109**(34):13602-13607-dən, Fig. 4C və D. "Structure of the yeast F_1F_0-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae."]

Daxili Mitoxondrial Membranda ATP-ADP Mübadiləsi Proton-Hərəkətverici Qüvvə ilə Təmin Olunur

Hüceyrədə proton-hərəkətverici qüvvə çoxsaylı enerji tələb edən prosesləri enerji ilə təmin etmək üçün istifadə olunur. ATP sintezini təmin etməkdən başqa, proton-hərəkətverici qüvvə daxili mitoxondrial membranda oksidativ fosforlaşma ilə mitoxondri daxilində əmələ gələn ATP-nin sitozolda ADP və P_i ilə mübadiləsini də həyata keçirir. Oksidativ fosforlaşmanın fasiləsiz şəkildə getməsi üçün ADP və P_i substratlarının təmin edilməsində tələb olunan bu mübadilə daxili mitoxondrial membranda iki zülalla həyata keçirilir: bir OH^- eksportu ilə bağlı olan bir HPO_4^{2-} importunu həyata keçirən *fosfat daşıyıcısı* (HPO_4^{2-}/OH^- antiporteri) və *ATP/ADP antiporteri* (Şəkil 12-35). ATP/ADP antiporter yalnız bir molekul ATP-nin çıxdığı halda bir molekul ADP-nin eyni zamanda daxil olmasına imkan verir. ATP/ADP antiporteri iki ədəd 30000-Da subvahidlərin dimeridir və daxili membran zülallarının 10-15 faizini təşkil edir, beləliklə o ən zəngin mitoxondrial zülallardan biridir. İki antiporterin birlikdə fəaliyyəti bir ADP^{3-} və bir P_i^{2-}-nin daxilə axmasını və bir ATP^{4-}-in OH^- ilə birlikdə xaricə axmasını həyata keçirir. Hər bir xaricə daşınan OH^- elektron daşınması zamanı membranlararası boşluğa translokasiya olunan protonla birləşərək H_2O əmələ gətirir. Bu ümumi reaksiyanı ATP-nin eksportu və ADP ilə P_i-un importu istiqamətində aparır.

Elektron nəqliyyatı zamanı mitoxondridən kənara çıxarılan protonlardan bəziləri (eksport olunan OH^- ilə birləşərək) ATP-ADP mübadiləsini enerji ilə təmin etdiyindən, ATP sintezi üçün az proton qalır. Belə təxmin edilir ki, kənara translokasiya olunan hər dörd protondan üçü bir molekul ATP sintezi üçün istifadə olunur biri isə ADP və Pi ilə mübadilə olunmaq üçün ATP-nin mitoxondridən kənara eksport olunmasında istifadə olunur. ADP və P_i ilə mübadilədə ATP-ni mitoxondridən eksport etmək üçün proton qatılığı qradientindən enerjinin belə sərf olunması sitozolda ATP-nin ADP-yə görə nisbətinin yüksək olmasını təmin edir, burada, ATP-nin yüksək enerjili fosfoanhidrid rabitəsinin hidrolizi enerj-tələb edən çoxsaylı reaksiyaların tələbini təmin edir.



ŞƏKİL 12-35 Daxili mitoxondrial membranda fosfat və ATP/ADP-in nəqliyyat sistemi. Elektron nəqliyyatı zamanı bir ATP^{4-} və bir hidroksillə mübadilədə bir ADP^{3-} və bir HPO_4^{2-}-un tutulması ilə nəticələnən iki antiporterin (bənövşəyi və yaşıl) koordinasiya olunan fəaliyyəti, bir protonun xaricə translokasiyası (elektron nəqliyyat zənciri zülalları vasitəsi ilə həyata keçən, mavi) ilə təmin edildi. Xarici membranlar burda göstərilmir, çünki onlar 5000 Da kiçik molekullar üçün keçiricidirlər.

ATP/ADP antiporterlərin fəaliyyəti barədə aparılan ilk tədqiqatlar təxminən 2000 il bundan qabaq, Dioskoridesin (miladın ~40-90 illəri) Aralıq dənizi bölgəsində geniş yayılmış

Atractylis gummifera zəhərli qanqal bitkisini təsvir etdiyi zaman qeydə alınmışdır. Eyni maddə Zulu xalqında çoxməqsədli ənənəvi istifadə olunan bitki mənşəli dərman vasitəsi *impila*da da (*Callilepis laureola*) tapılmışdır. Zulu dilində *impila* "*sağlamlıq*" ("*səhiyyə*") deməkdir, hərçənd ki, bu bitki çoxsaylı zəhərlənmələrlə əlaqəli olmuşdur. 1962-ci ildə göstərilmişdir ki, bu bitkidə olan fəal maddə, ATP/ADP antiporterini ingibirləşdirən **atraktilosida**, mitoxondridaxili deyil, məhz mitoxondrixarici ADP-nin oksidativ fosforlaşmasını ingibirləşdirir. Bu, kəşf ATP/ADP antiporterin əhəmiyyətini nümayiş etdirdi və bu daşıyıcının fəaliyyət mexanizmini öyrənmək üçün çox güclü vasitə oldu.

Dioskorides Tarsa yaxınlığında, Romanın, indiki Türkiyənin yerləşdiyi cənubşəriqi Kiçik Asiya vilayətində yaşamışdır. Onun beş cilddən ibarət olan, "dərmanların hazırlanması, xassələri və sınağı" üzrə *De Materia Medica* (*Təbabət Materialları*) adlı kitabı 1000-ə yaxın təbii məhsulların tibbi xüsusiyyətlərini və onların 4740 tibbi dərman məhsulu kimi istifadələrini təsvir etmişdir. Təxminən 1600 il Şimali Avropadan Hind okeanına qədər ərazidə təbabətdə əsas sitat mənbəyi olmuşdur, dərmanlardan istifadə etmək qaydası olan bugünki *Həkimlərin Stolüstü İstinadı* ilə müqayisə edilə bilər.

Mitoxondrial Oksidləşmənin Sürəti Normal Halda ADP Səviyyəsindən Asılıdır

Əgər ayırılmış intakt mitoxondri NADH (və ya $FADH_2$ mənbəyi, məsələn suksinat ilə) və əlavə edilmiş O_2 və P_i ilə təmin olunursa, amma ADP ilə olunmursa, NADH-ın oksidləşməsi və O_2-nin reduksiyası sürətlə azalır (dayanır), çünki endogen ADP-nin miqdarı ATP əmələ gəlməsi ilə sərf olunub qurtarır. Əgər, bundan sonra sonra ADP əlavə olunarsa, NADH-ın oksidləşməsi sürətlə bərpa olunur. Beləliklə, mitoxondri $FADH_2$ və NADH-ı yalnız ATP-nin sintez etmək üçün ADP və P_i mənbəyinin mümkün olduğu halda oksidləşdirə bilir. **Tənəffüs nəzarəti** adlann bu hadisə ona görə baş verir ki, NADH və suksinat ($FADH_2$) daxili mitoxondrial membranda mütləq şəkildə proton daşınmasında birləşir. Əgər, nəticədə əmələ gələn proton-hərəkətverici qüvvə ADP və P_i-dan ATP sintezi zamanı (və ya başqa enerji-tələb edən proseslər zamanı) dağılmırsa həm transmembran proton qatılığı qradienti həm də membran elektrik potensialı çox yüksək səviyyəyə qədər artır. Bu halda, daxili membranda əlavə protonların vurulması o qədər enerji tələb edir ki, nəticədə tədricən o dayanır, bunlarla bağlı olan NADH və başqa substratların oksidləşməsini blok edir.

Qonur-Piy Mitoxondrisi İstilik Yaratmaq Üçün Proton-Hərəkətverici Qüvvəsindən İstifadə Edir

Rəngi onlarda çoxlu miqdarda mitoxondrinin olması ilə əlaqəli olan *Qonur-piy toxuması* istiliyin yaradılması üçün ixtisaslaşmışdır. Əksinə, *ağ-piy toxumaları* piylərin saxlanılması üçün ixtisaslaşmışdır və az mitoxondriyə malikdirlər.

Qonur-piy mitoxondrisinin daxili membranı ***termogenin*** zülalına malikdir, bu zülal oksidativ fosforlaşmanın və proton-hərəkətverici qüvvənin yaranmasının təbii **ayırıcı-agenti** kimi fəaliyyət göstərir. Termogenin və ya UCP1 zülalı əksər eukaryotlarda tapılmış (amma fermentativ mayada tapılmamış) bir sıra ayırıcı zülallardan (uncoupling proteins – UCPs) biridir. Termogenin daxili mitoxondrial membranı protonlar üçün keçirici etməklə protom-hərəkətverici qüvvəni dağıdır. Nəticədə, elektron nəqliyyat zəncirində NADH oksidləşməsindən ayrılan və proton qradientinin yaradılmasında istifadə olunan enerji sonra ATP-sintaza vasitəsi ilə ATP sintezində istifadə olunmur. Bunun əvəzində, protonlar termogenin vasitəsi ilə qatılıq qradientlərinin aşağıya (azalan) istiqamətində geriyə, matrisaya qayıdır, enerji istilik kimi ayrılır. Termogenin proton kanalı deyil, o proton daşıyıcısıdır və protonları membranda tipik ion kanallarına nisbətən million dəfə aşağı sürətlə daşıyır (shittle) (bax Şəkil 11-2). ATP/ADP transporter ailəsini təşkil edən bir çox digər mitoxondrial transporter zülallar kimi, termogenin də ardıcıllığına görə mitoxondrial ATP/ADP transporterinə oxşardır. Bəzi kiçik molekullu zəhərlər, ayırıcılar kimi daxili mitoxondrial membranı protonlar üçün keçirici etməklıə fəaliyyət göstərirlər. Buna aid olan bir nümunə, lipiddə-həllolan kimyəvi maddə 2,4-dinitrofenol (DNP) geriyə dönə bilən şəkildə protonlara birləşə və onları azad edə bilir, sonra isə onları membranlar arası boşluqdan daxili membrana keçirərək matrisaya daşıyır.

Ətraf mühit şəraiti qonur-piy mitoxondrilərində termogeninin miqdarını tənzimləyir. Məsələn, siçovulların soyuğa uyğunlaşması zamanı, onların toxumalarının istilik yaratmaq qabliyyəti termogenin zülalının sintez olunmasının induksiya olunması ilə yüksəlir. Soyuğa uyğunlaşmış heyvanlarda termogenin daxili mitoxondrial membranda ümumi zülalların 15 faizə qədərini təşkil edə bilir.

Uzun illər belə məlum olmuşdur ki, kiçik heyvanlar və insan körpələri kifayət qədər yüksək miqdarda qonur piy istehsal edir, amma yetkin insan orqanizmlərində onun çox əhəmiyyətli rol oynaması barədə sübutlar həddən ziyadə azdır. Yeni doğulmuş körpədə qonur-piy mitoxondrilər vasitəsi ilə termogenezis, qış yuxusuna gedən heyvanlarda olduğu kimi, sağ qalmaq üçün həyati əhəmiyyətə malikdir. Xəzli suitilərdə və soyuğa təbii akklimatizasiya olunan başqa heyvanlarda əzələ-hüceyrəsinin mitoxondriləri termogeninə malik olurlar, nəticədə proton-hərəkətverici qüvvənin əksər hissəsi istilik yaratmaq üçün istifadə olunur, bununla da bədən temperaturu saxlanılır. Son zamanlar tədqiqatçılar qonur piyin mövcud olmasını, soyuğa məruz qoyulma zamanı onun miqdarının əhəmiyyətli dərəcədə artdığını yetkin insanın boynunda, körpücük sümüyündə və başqa hissələrində qəti şəkildə müəyyən etmək üçün yüksək dərəcədə inkişaf etmiş funksional təsvirlər yaradan metodlardan (məsələn, pozitron-emissiyalı tomoqrafiyadan) istifadə etdilər. Bundan başqa, termgen piy hüceyrələrinin biokimyəvi xassələrinin və inkişaf mənşəyinin hərtərəfli analizi belə hüceyrələrin ən azı iki tipini aşkar etdi: klassik qonur-piy hüceyrəsi, bunlar skelet əzələ hüceyrələrinin də yaranmasında istifadə edilən sələf hüceyrələrdən törəyirlər, digəri isə *bej-piy hüceyrələri*dir, bunların ətraflı xassələri (gen ekspressiyası profili, hormonal siqnallara cavabı) qonur-piy hüceyrələrindəkindən fərqlənir. Bej-piy hüceyrələrinin daha da xarakterizə olunması və onların normal metabolizmə və xəstəliklərə təsiri bəzi metabolik pozuntuların müalicəsi və ya qarşısının alınmasında yeni yanaşmalara gətirib çıxara bilər.

12.5 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Proton-Hərəkətverici Qüvvənin ATP Sintezinə Qoşulması

- Peter Mitchel, daxili mitoxondrial membranda proton-hərəkətverici qüvvəsinin ATP sintezi üçün birbaşa enerji mənbəyi olmasını göstərən kemiosmotik nəzəriyyəmi irəli sürmüşdür.
- Bakteriyalar, mitoxondrilər və xloroplastlar hamısı ATP əmələ gətirmək üçün eyni kemiosmotik mexanizmdən və oxşar ATP sintazadan istifadıə edirlər (bax Şəkil 12-30).
- ATP sintaza (həmçinin F_0F_1 kompleksi adlanır), protonlar daxili mitoxondrial membranla (bakteriyalarda plazma membranında) elektrokimyəvi proton qradientlərinin azalan istiqamaətində aşağıya doğru axarkən ATP sintezini kataliz edir.
- F_0 orqanizmdən asılı olaraq 8-14 **c** subvahidlərindən ibarət olan halqaya malikdir, bu da sərt şəkildə F_1-in çöp-şəkilli γ subvahidi ilə və ε subvahidi ilə əlaqəlidir. Bu subvahidlər ATP sintezi zamanı birlikdə fırlanırlar. Yuxarıda, üstündə oturan γ subvahid $F_1[(\alpha\beta)_3]$-in heksamerin dəstəyidir və mitoxondri matrisasına (bakteriyalarda sitozola) dik uzanır. Üç β subvahid ATP sintez edən mərkəzlərdir (bax Şəkil 12-31 və 12-34a və b).
- Fırlanmayam $(\alpha\beta)_3$ heksamerin ortasından keçən və paylayıcı val rolunu oynayan, F_1 γ subvahidin fırlanması üç F_1 β subvahidlərində nukleotid-birləşdirən mərkəzlərin konformasiya dəyişilmələrinə səbəb olur (bax Şəkil 12-32). Bu birləşmə-dəyişilməsi mexanizmi ilə β subvahid ADP və P_i-a birləşir və ATP əmələ gətirmək üçün onları kondensasiya edir və sonra ATP-ni buraxır. c, γ və ε subvahidlərin toplusunun etdiyi hər bir dövrədə üç ATP sintezi olunur.
- Protonların membranda F_0 **a** subvahidin **c** halqa ilə ara üzündə iki yarım kanalla hərəkəti (keçməsi) **c** halqanın ona birləşmiş F_1 ε və γ subvahidlərlə birlikdə fırlanmasını (enerji ilə) təmin edir.
- F_0F_1 kompleksi daxili mitoxondrial membranı əyir, onun yüksək dərəcədə burulmasına və kristaların boruvari və blinçik-formalı quruluşunun alınmasına kömək edir (bax Şəkil 12-34c və d).
- Proton-hərəkətverici qüvvə mitoxondrial ATP və OH^--ın mübadiləsində sitozoldan P_i və ADP-nin udulmasını da enerji ilə təmin edir, beləliklə də ATP sintezi üçün mümkün olan enerjini azaldır. Bu mübadilədə iştirak edən ATP/ADP antiporter daxili mitoxondrial membrandakı ən çox olan zülaldan biridir (bax Şəkil 12-35).
- NADH-ın mitoxondridə davam edən oksidləşməsi və O_2-nin reduksiyası ADP-nin matrisaya kifayət qədər daxil ollmasından asılıdırlar. Tənəffüs nəzarəti adlandırılan bu hadisə mitoxondridə ATP sintezi ilə oksidləşməni əlaqələndirmək üçün çox əhəmiyyətli mexanizmdir.
- Qonur piydə daxili mitoxondri membranında proton-hərəkətverici qüvvəni istilik şəkilində dağıdan proton daşıyıcısı olan ayırıcı zülal termogenin vardır. Müəyyən kimyəvi maddələr (məsələn, DNP) ayırıcılar kimi fəaliyyət göstərirlər və oksidativ fosforlaşmanı elektron nəqliyyatından ayıraraq eyni təsiri göstərirlər. Termogen piy hüceyrələrinin iki müxtəlif tipi var: qonur-piy və bej-piy hüceyrələri.

12.6 Fotosintez və İşıq-Udan Piqmentlər

Biz indi diqqətimizi fotosintezə, ATP sintez edən ikinci əsas prosesə yönəldirik. Bitkilərdə, fotosintez, əsasən yarpaq hüceyrələrində tapılan böyük orqanoidlərdə, xloroplastlarda baş verir. Fotosintez zamanı xloroplastlar günəş işığının enerjisini tuturlar, onu ATP və NADPH şəkilində kimyəvi enerjiyə çevirirlər və sonra da, bu enerjini mürəkkəb birləşmələr olan karbohidratların sudan və karbon qazından sintezində istifadə edirlər. İstehsal olunan əsas karbohidratlar heksoza (altı-karbonlu) şəkərlərin polimerləridirlər: saxaroza qlükoza ilə fruktozanın disaxaridid‌ir (bax şəkil 2-19) və yarpaqda **nişasta** qlükozanın amiloza və amilopektin adlanan iki tip həll olmayan polimerlərinin qatışığıdır. Nişasta bitkilərdə ehtiyat kimi saxlanılan əsas karbohidratdır (Şəkil 12-36). Nişasta xloroplastlarda sintez olunur və saxlanılır. Saxaroza isə xloroplastlarda sintez olunmuş üç-karbonlu sələflərdən sitozolda sintez olunur, sonra o bitkinin fotosintez etməyən (yaşıl olmayan) digər toxumalarına (məsələn, köklər və toxumlar) daşınır, burada əvvəlki bölmələrdə təsvir olunan yolla enerji əmələ gətirmək üçün metabolizmə qoşulur.

Fotosintez bitkilərdə və eləcə də digər eukaryotik birhüceyrəli yosunlarda və bir sıra fotosintezedici bakteriyalarda (məsələn, sianobakteriyalarda və proxlorofitlərdə) da həmçinin oksigeni əmələ gətirirlər. Oksigen əmələ gətirən fotosintezin ümumi reaksiyası:

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O \rightarrow 6\,O_2 + C_6H_{12}O_6$$

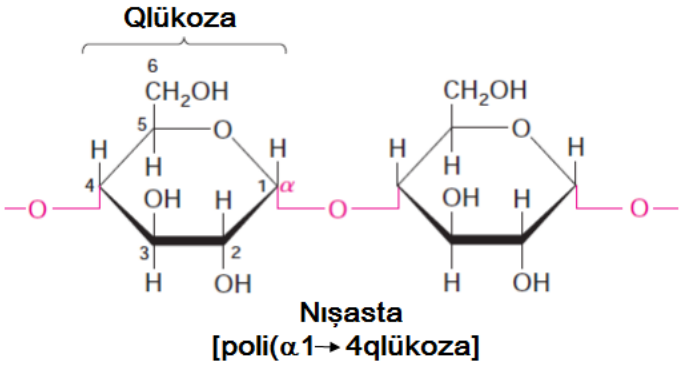
karbohidratların CO_2 və H_2O qədər oksidləşdiyi reaksiyanın əksinə gedən ümumi reaksiyadır. Faktiki olaraq, fotosintez xloroplastlarda enerji ilə-zəngin şəkərləri istehsal edir ki, bunlar da mitoxondrilərdə oksidativ fosforlaşmadan istifadə etməklə parçalanaraq enerjı əldə edilir.

Baxmayaraq ki, yaşıl və purpur bakteriyalar da fotosintez edirlər, amma onlar oksigen əmələ gətirməyən prosesdən istifadə edirlər. 12.7 Bölməsində müzakirə olunduğu kimi, bu bakteriyalarda fotosintetik sistemin hərtərəfli analizi oksigen-əmələ gətirən fotosintezin ümumi prosesinin ilkin mərhələsini izah etməyə kömək etdi. Biz bu bölmədə oksigen-əmələ gətirən fotosintezin mərhələlərinə ümumi nəzər yetirəcəyik və əsas molekulyar komponentləri, o cümlədən işıq-toplayan piqmentləri – xlorofilləri təqdim edəcəyik.

Xloroplastlarda Tilakoid Membranları Bitkilərin Fotosintezedici Mərkəzlərdir.

Xloroplastlar linza-şəkilli orqanoidlər olub, diametri təxminən 5 μm və eni təxminən 2.5 μm-dir. Onlar 3000 qədər müxtəlif zülala malikdirlər, bunların 95 faizi nüvədə kodlaşdırılaraq sitoplazmada sintez olunur, orqanoidə import olunur və sonra da lazım oan membrana və ya böşluğa daşınır (bax Fəsil 13). Xloroplastlar, xlorofilə malik olamayan, ATP və NADPH-ın işıqla həyata keçirilən istehsalında birbaşa iştirak etməyən iki

membranla əhatə olunublar (Şəkil 12-37 və 12-38). Mitoxondridə olduğu kimi, xloroplastların xarici membranı porinlərə malikdir, ona görə də kiçik molekul çəkili metabolitlərə keçiricidirlər. Daxili membran, metabolitlərin orqanoid daxilinə və xaricinə daşınmasını tənzimləyən daşıyıcı (transport) zülallara malik olan keçiricilik baryerini əmələ gətirir.

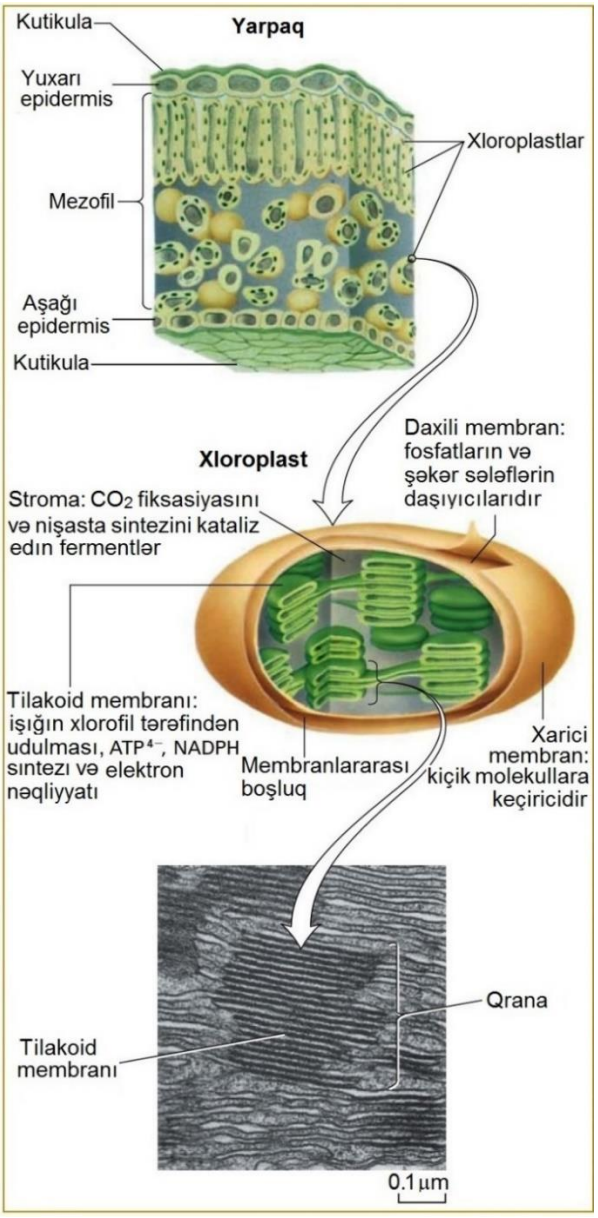


ŞƏKİL 12-36 Nişastanın quruluşu. Qlükozanın böyük polimeri və disaxarid saxaroza (bax Şəkil 2-19) fotosintezin əsas son məhsullarıdır. Hər ikisi altı-karbonlu şəkərlərdən (heksozalardan) təşkil olunmuşlar.

Mitoxondrilərdən fərqli olaraq, xloroplastlar üçüncü membrana—*tilakoid membranına* malikdirlər, bu membranlarda işıq enerjisi ilə ATP və NADPH-ın yaranması baş verir. Xloroplast tilakoid membranları, hesab edilir ki, çoxsaylı kiçik, öz aralarında birləşən, yastılaşmış quruluşu**, tilakoidi** əmələ gətirən tək təbəqəni təşkil edir, bunlar da adətən nizamla yığılmış *qranalar* adlanın düzümlərdən təşkil olunmuşlar (bax Şəkil 12-37). Tilakoidlər arasındakı boşluqlar vahid uzanan kompartmenti, *tilakoid lümenini* əmələ gətirirlər. Tilakoid membranları çoxsaylı inteqral membran zülallarına malikdirlər, bunlara bir sıra çox əhəmiyyətli prostetik qruplar və işıq-toplayan piqmentlər, xüsusən də xlorofillər birləşmişdir. Nişastanın sintezi və ehtiyat şəklində saxlanılması *stromada*, tilakoid membranı ilə daxili membran arasındakı sulu fazada baş verir. Fotosintezedici bakteriyalarda plazma membranının geniş invaqinasiyası (bükülmələri) daxili membranlar dəstini yaradır, bu həmçinin fotosintezin baş verdiyi tilakoid membranları adlanır.

Xloroplastlar Böyük DNT-yə Malikdirlər və Çox Hallarda Yüzdən Artıq Zülalı Kodlaşdırırlar

Mitoxondrilər kimi, xloroplastlar da guman olunur ki, əcdad endosimbiotik bakteriyadan törəmişlər (bax Şəkil 12-7). Amma, mitoxondrinin təkamüli ilə (1.5 – 2.2 milliard il öncə) müqayisədə xloroplastların yaranmasına səbəb olan endosimbiotik hadisələr son zamanlar (1.2 – 1.5 milliard il öncə) meydana gəlmişdir. Uyğun olaraq, müasir xloroplast DNT-si mitoxondrial DNT-yə nisbətən daha az quruluş müxtəlifliyini nümayiş etdirir. Həmçinin, mitoxondri kimi, xloroplast da orqanoid DNT-sinin çoxsaylı nüxsələrinə və eləcə də ribosomlara malik olur ki, bunlar da standard genetik koddan istifadə edərək xloroplast DNT-si ilə kodlaşdırılan bəzi xloroplast zülallarını sintez edirlər. Bitki mtDNT kimi, xloroplast DNT-si də eksklusiv olaraq irsən bir valideyindən, dişi valideyindən (yumurtadan) alınır. Digər xloroplast zülalları nüvə genləri ilə kodlaşdırılır, sitozol ribosomunda sintez olunur və sonra orqanoidə keçirilir (bax Fəsil 13).



ŞƏKİL 12-37 Yarpağın və xloroplastın quruluşu. Mitoxondri kimi, bitkilərdə xloroplastlar bir-birindən membranlararası boşluqla ayrılan iki membranla əhatə olunmuşlar. Fotosintez üçüncü membranda, daxili membranla əhatə olunmuş və çoxsaylı yastılaşmış qovucuqları (tilakoidləri) əmələ gətirən, öz aralarında birləşmiş vahid *lumen* boşluğunu əhatə edən tilakoid membranlarında baş verir. Bitkilərdəki yaşıl rəng xlorofillərin yaşıl rənginə görədir, və bunların hamısı tilakoid membranlarında yerləşirlər. Qrana qonşu (birbirinə bitişik) tilakoidlərin toplusudur. Stroma daxili membranla tilakoidlər arasındakı boşluqdur. [Mikrofotoqrafiya, hörmətlə Katherine Esau-nun xüsusi kolleksiyasından, University of California Library, Davis.]

Ali bitkilərdə xloroplast DNT-si bitkinin növündən asılı olaraq 120-160 kə uzunluqdadır. Bitki xloroplast DNT-si uzun başdan-quyruğa xətti konkatemerlər və üstə gəl bu uzun molekullar arasında rekombinasiya intermediatlarından təşkil olunmuşdur. Onlar 120-135 genə, çox əhəmiyyətli model bitki olan *Arabidopsis thaliana*-da isə 130 genə malikdirlər. *A. thaliana* xloroplast DNT-si 76-zülal kodlaşdıran geni və rRNT ilə tRNT-lər kimi RNT məhsulu olan 54 geni kodlaşdırır. Xloroplast DNT-ləri bakteriya-bənzər RNT polimerazanı kodlaşdırırlar və onlar bakteriyalarda (bax Şəkil 5-13a) olduğu kimi, öz genlərini polisistron operonlardan ekspressiya edirlər. Bəzi xloroplast genlərində intronlar vardır, amma bu intronlar nüvə intronlardan daha çox bəzi bakterial genlərdə, həmçinin protozoaların və göbələklərin mitoxondrial genlərində tapılmış ixtisaslaşmış intronlara oxşayırlar. Xloroplastın funksiyası üçün vacib olan çox genlər təkamülün gedişində bitkinin nüvə genomuna keçirilmişdir. *A. thaliana*-nın və sianobakteriaların genom ardıcıllığı analizlərindən alınan son zamanların hesablamaları göstərir ki, haradasa 4500 qədər gen ilkin endosimbiotdan bitki nüvə genomuna keçirilmişdir.

Maya hüceyrələrinin transformasiyasında istifadə olunan oxşar metodlar (bax Fəsil 6) ali bitkilərin xloroplastına xarici DNT-nin stabil transformasiyası metodu işlənilib hazırlanmışdır. Hər hüceyrəyə görə böyük sayda xloroplast DNT-si molekulları yaradılmış genin minlərlə nüsxədə hər bir hüceyrə daxilinə keçirilməsinə imkan verir, nəticədə bitki hüceyrəsində, yaradılmış bakteriyada alınanlarla müqayisə oluna bilən həddən yüksək səviyyədə xarici zülalın sintezinə nail olunur. Xloroplast transformasiyası bakterial və göbələk yoluxmasına, quraqlığa və herbisidlərə dözümlü olan bitkilərin və eləcə də insanların əcazçılıq dərmanlarını hzırlamaq üçün istifadə olunan (*farminq* adlanan) bitkilərin yaradılmasına səbəb oldu. Ilk belə yetişdirilən (farming) dərman Amerika Birləşmiş Ştatlarında 2012-ci ildə uşaqlar üçün və 2014-cü ildə yaşlılar üçün, genetik pozuntu olan Koçer xəstəliyinin müalicəsi üçün qəbul olunan ferment olunmuşdur. Bu yanaşma insanlar üçün zəruri olan bütün amin turşularının yüksək səviyyəsinə malik olan qida məhsullarının hazırlanmasında da istifadə oluna bilər.

Fotosintezin Dörd Mərhələsinin Üçü Yalnız İşıqlandırma Zamanı Baş Verir

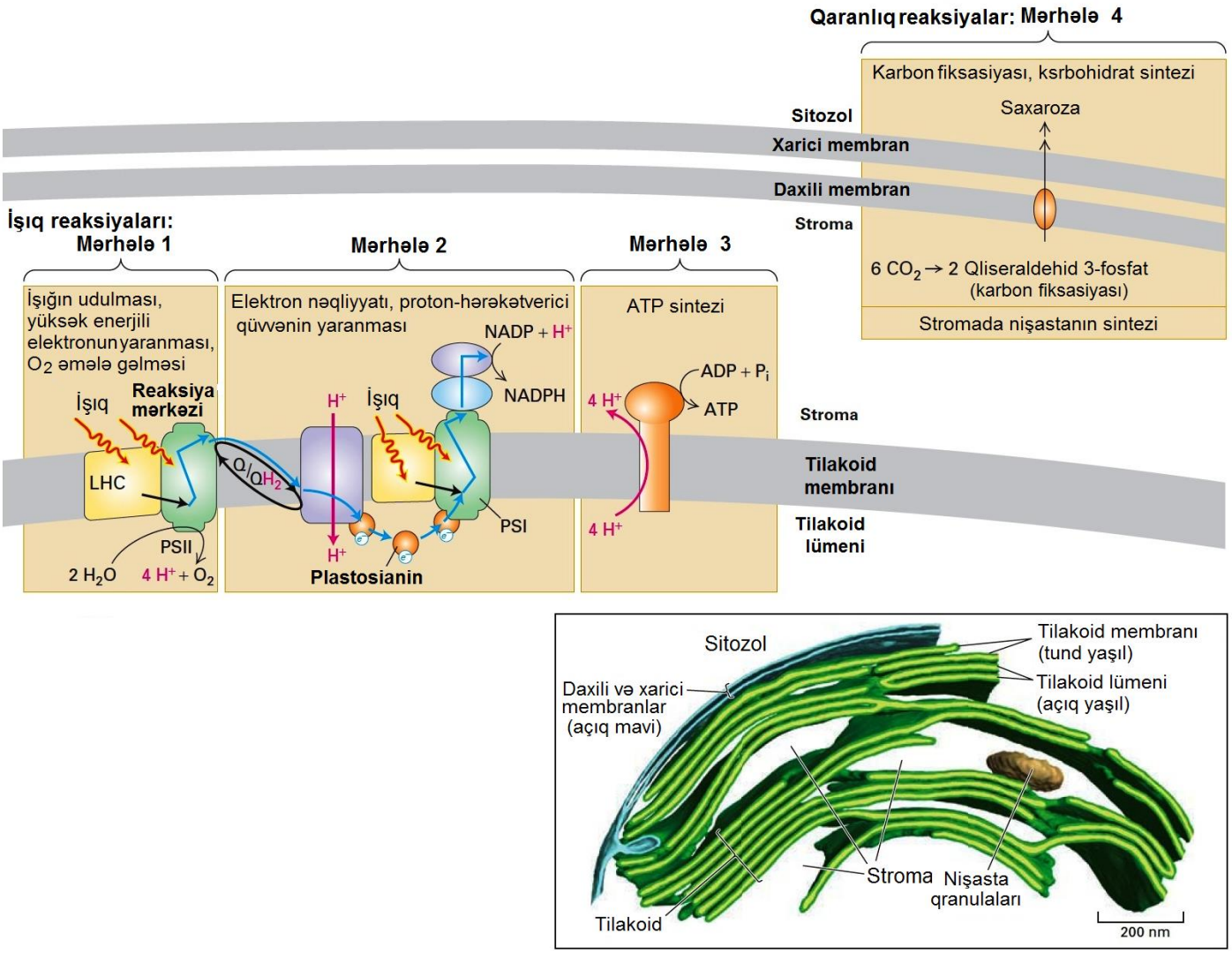
Bitkilərdə fotosintez prosesi dörd mərhələyə bölünə bilər (Şəkil 12-38), hər bir mərhələ xloroplastın müəyyən sahəsində baş verir: (1) işığın udulması, yüksək-enerjili elektronun yaranması və H_2O-dan O_2-nin əmələ gəlməsi; (2) $NADP^+$-ın NADPH-a reduksiya olunması ilə nəticələlnən elektron nəqliyyatı və proton-hərəkətverici qüvvəsinin yaranması; (3) ATP sintezi; və (4) ümumilikdə **karbon fiksasiyası** adlandırılan CO_2-nın karbohidratlara çevrilməsi. CO_2-nı kimyəvi aralıq məhsullara çevirən və sonra da onları nişastaya çevirən fermentlər xloroplast stromasının həll-olan tərkib hissələridir, üç-karbonlu aralıq məhsullardan saxarozanı əmələ gətirən fermentlər isə sitozolda yerləşirlər. Fotosintezin bütün dörd mərhələsi sıx şəkildə bir-biri ilə bağlıdır və elə nəzarət olunuir ki, bitki tərəfindən tələb olunan miqdarda karbohidrat istehsal olunsun. 1-dən 3-ə qədər mərhələdə olan bütün reaksiyalar tilakoid membranlarında olan multizülal kompleksləri tərəfindən kataliz olunurlar. Proton-hərəkətverici qüvvənin yaranması və proton-hərəkətverici qüvvənin ATP sintezində istifadə olunması mitoxondrial oksidativ fosforlaşmanın III və IV mərhələlərinə bənzəyir.

Mərhələ 1: İşıq Enerjisinin Udulması, Yüksək Enerjili Elektronların Yaranması və O_2 Əmələ Gəlməsi Fotosintezin ilkin mərhələsi tilakoid membranlarında zülallara birləşmiş xlorofillər tərəfindən işığın udulmasıdır. Sitoxromların hem komponenti kimi, xlorofillər uzun karbohidrogen yan zəncirə birləşmiş porfirin halqalarından təşkil olunmuşlar (Şəkil 12-39). Hemlərdən fərqli olaraq (bax Şəkil 12-20) xlorofillər mərkəzlərində (Fe^{2+} əvəzinə) Mg^{2+} ionlarına malikdirlər və əlavə beş-üzvlü halqaya malikdirlər. Udulmuş işığın enerjisi sonda donordan (yaşıl bitkilərdə sudan) elektronların ayrılması və O_2-nin əmələ gəlməsində istifadə olunur:

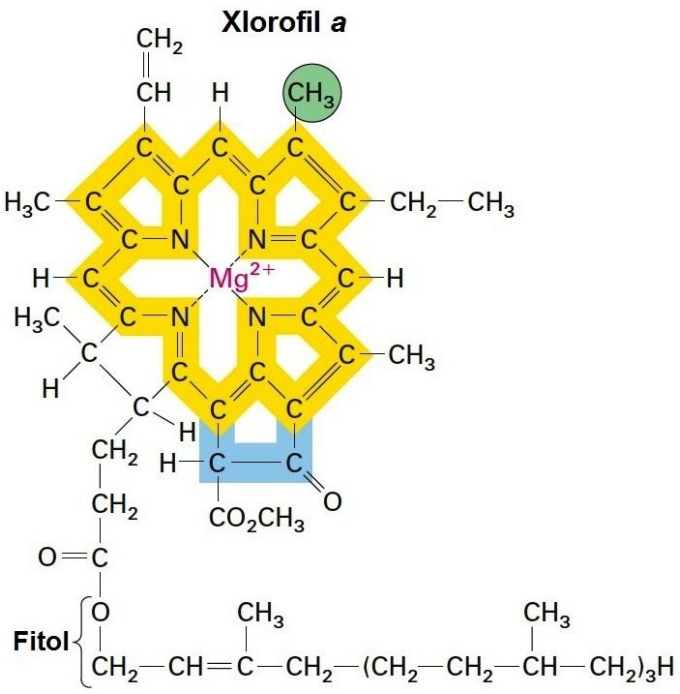
$$2\,H_2O \xrightarrow{\text{işıq}} O_2 + 4\,H^+ + 4\,e^-$$

Elektronlar *ilkin* (*əsas*) *elektron akseptorlara*, mitoxondridəki CoQ oxşar olaraq, Q kimi işarə olunan xinona ötürülür. Bitkilərdə, suyun oksidləşməsi *fotosistem II* (*PSII*) adlanan multizülal kompleksdə baş verir.

Kvant mexanikası müəyyən etdi ki, elektromaqnit şüalanma forması olan işıq həm dalğa, həm də zərrəcik xüsusiyyətlərinə malikdir. İşıq materiya ilə qarşılaşanda o özünü enerjinin *fotonlar* adlanan diskret paketi (kvant) kimi aparır. Fotonun enerjisi işıq dalğalarının tezliyi ilə mütənasibdir və beləliklə, onun dalğa uzunluğu ilə tərs mütənasibdir. Ona görə də, *daha qısa uzunluqlu* dalğaların fotonları *daha yüksək* enerjiyə malik olur. Görünən işığın enerjisi kifayət qədər çoxdur. 550 nm (550×10^{-7} cm) dalğa uzunluqda olan işıq, tipik günəş işığı, hər mol fotona görə 52 kkal enerjiyə malikdir. Bu enerji kifayət edir ki, ADP və P_i-dan birt neçə mol ATP sintez olunsun, əgər bütün enerji bu məqsədlə istifadə olunarsa.



ŞƏKİL 12-38 Fotosintezin dörd mərhələsinə ümumi baxış. 1-ci məhələdə işıq işıq-toplayan komplekslər (LHC) və II fotosistemin (PSII) reaksiya mərkəzi tərəfindən udulur. LHC-lər udulmuş enerjini reaksiya mərkəzinə ötürür, burada onu və ya birbaşa fotondan alınan enerjini suyun molekulyar oksigenə qədər oksidləşməsində və yüksək enerjili elektronların yaranmasında (elektronların keçdiyi yol mavi oxlarla göstərilir) istifadə edir. **2-ci mərhələdə**, bu elektronlar elektron nəqliyyat zəncirində aşağıya doğru, ya lipiddə-həll olan (Q/QH_2) ya da suda-həll olan elektron daşıyıcılarından (plastosianin, PC) istifadə edərək elektronların çoxsaylı zülal kompleksləri arasında ötürülməsi (shuttle) ilə hərəkət edirlər. Elektronlar zəncirlə aşağıya doğru hərəkət etdikcə, onlar enerjini buraxırlar, bu zaman komleklər bundan proton-hərəkətverici qüvvənin yaradılmasında istifadə edirlər, I fotosistemlə (PSI) udulan əlavə enerjinin daxil olmasından sonra yüksək-enerjili elektron daşıyıcı NADPH sintez olunur. **3-cü mərhələdə** protonların qatılıq qradientinin və gərginlik qradientinin azalan istiqamətində aşağıya hərəkəti ilə F_0F_1 ATP sintaza vasitəsi ilə ATP sintez edilir. Bitkilərdə mərhələ 1-3 xloroplastların tilakoid membranlarında baş verir. **4-cu mərhələ**, xloroplast stromasında NADPH və ATP kimi ehtiyat toplanan enerji, CO_2-nin ilkin üç-karbonlu molekullara (qliseraldehid 3-fosfata) çevrilməsində istifadə olunur və bu proses karbon fiksasiyası kimi məlumdur. Sonra molekullar, saxaroza şəkilində altı-karbonlu karbohidratlara (heksozalara) çevrilmək üçün hüceyrə sitozoluna daşınır. Qliseraldehid 3-fosfat xloroplastlar tərəfindən nişastanın sintez olunmasında da istifadə olunur. Şəkilə əlavə: Birhüceyrəli yaşıl yosun *Chlamydomonas reinhardtii* xloroplastında krioelektron tomoqrafiyadan alınan üç-ölçülü rekonstruksiya tilakoid membranlarını (tünd yaşıl), tilakoid lümenlərini (açıq yaşıl), daxili və xarici membranları (mavi) və bir kiçik nişasta qranulasını (sarı şabalıdı) göstərir. [Əlavə edilmə Engel, B. D., et al., "Native architecture of the Chlamydomonas chloroplast revealed by in situ cryo-electron tomography," *eLIFE*, 2015; **4**: e04889.]



ŞƏKİL 12-39 İşıq enerjisini tutan əsas piqment olan xlorofil *a*-nın quruluşu. Elektronlar xlorofil ***a***-nın dörd mərkəzi halqasından (sarı) üçünün arasında və onları bir-biri ilə birləşdirən atomlar arasında yerlərini dəyişirlər (delokalizasiya olunurlar). Xlorofildə hemidə olan Fe^{2+} ionları əvəzinə tapılmış Mg^{2+} ionları porfirin halqanın ortasında oturur və beşinci əlavə halqa göstərilir. Əks hallarda, xlorofilin quruluşu hemoqlobində və sitoxromlarda tapılmış hemin quruluşu ilə oxşar olardı (bax Şəkil 12-20a). Karbohidrogen fitol "quyruq" xlorofilin xlorofil-birləşdirən zülalların hidrofob rayonuna birləşməsinə imkan yaradır. CH_3 qrupu (yaşıl) xlorofil ***b***-də formaldehidlə (CHO) əvəz olunur.

Mərhələ 2: Elektron Nəqliyyatı və Proton-hərəkətverici qüvvənin Yaranması Elektronlar əsas elektron akseptoru xinondan bir sıra elektron daşıyıcıları vasitəsi ilə son elektron akseptoruna, adətən **nikotinamid adenin dinukleotid fosfatın** (**NADP**$^+$) oksidləşmiş formasına çatana qədər hərəkət edib onu NADPH-a reduksiya edirlər. $NADP^+$-ın quruluşu əlavə bir fosfat qrupunun olması istisna olmaqla NAD^+-ın quruluşu ilə identikdir. Hər iki molekul eyni yolda elektronları qəbul edir və buraxır (bax Şəkil 2-33). Bitkilərdə, $NADP^+$ reduksiyası *fotosistem I* (*PSI*) adlanan kompleksdə baş verir. Elektronların tilakoid membranda daşınması protonların stromadan tilakoid lümeninə hərəkərti ilə bağlanaraq membranda pH qradientini yaradır ($pH_{lümen} < pH_{stroma}$). Bu proses, mitoxondrilərdə daxili membranda və bakterial membranlarda elektron nəqliyyatı zamanı proton-hərəkətverici qüvvənin yaranması ilə analojidir (bax Şəkil 12-29).

Beləliklə, 1-ci və 2-ci mərhələlərin reaksiyaları belə ümumiləşdirilə bilər:

$$2\ H_2O + 2\ NADP^+ \xrightarrow{\text{işıq}} 2\ H^+ + 2\ NADPH + O_2$$

Mərhələ 3: ATP sintezi Protonlar qatılıq qradientinin aşağıya azalan istiqamətində F_0F_1 kompleksi (ATP sintaza) vasitəsi ilə tilakoid lümenlərindən stromaya hərəkət edirlər, bizim artıq mitoxondridə və bakteriyalarda ATP sintezində gördüyümüz kimi, proton-hərəkəti ADP və P_i-dan ATP sintezinə bağlayır (bax Şəkillər 12-31, 12-32 və 12-34).

Mərhələ 4: Karbon Fiksasiyası Fotosintezin 2-ci və 3-cü mərhələlərində yaranan NADPH və ATP CO_2 və H_2O-dan altı-karbonlu şəkər polimerlərinin sintezini aparmaq üçün enerjini və elektronları təmin edirlər. Reaksiyanın ümumi kimyəvi tənliyi belə olacaq:

$$6\ CO_2 + 18\ ATP^{4-} + 12\ NADPH + 12\ H_2O \rightarrow$$
$$C_6H_{12}O_6 + 18\ ADP^{3-} + 18\ P_i^{2-} + 12\ NADP^+ + 6\ H^+$$

Karbon fiksdasiyasında istifadə olunan ATP və NADPH əmələ gətirən reaksiyalar işıq enerjisindən birbaşa asılıdır; beləliklə, mərhələ 1-3 fotosintezin *işıq reaksiyaları* adlandırılır. 4-cü mərhələdəki reaksiyalar işıqdan dolayı yolla asılıdır; ona görə də, çox zaman fotosintezin *qaranlıq reaksiyaları* adlandırılır, çünki onlar, işıq enerjisi vasitəsi ilə yaradılan ATP və NADPH-dan istifadə etməklə qaranlıqda baş verə bilirlər. Amma, 4-cü mərhələdəki reaksiyalar qaranlıqla məhdudlaşmırlar; faktiki olaraq, onlar işıqlanma zamanı da baş verirlər.

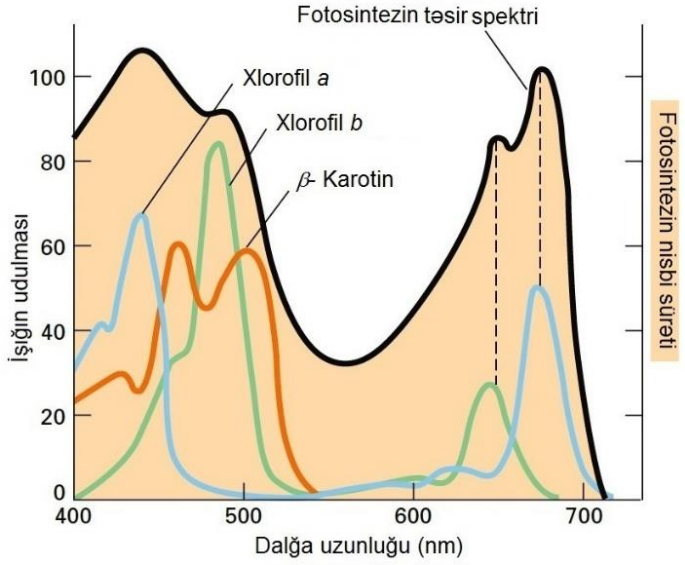
Fotosistemlər Reaksiya Mərkəzləri və Onlarla Assosasiyada olan Işıq-Toplayan Komplekslərdən İbarətdir

İşıq enerjisinin udulması və onun kimyəvi enerjiyə çevrilməsi **fotosistemlər** adlanan multizülal komplekslərində baş verir. Bütün fotosintetik orqanizmlərdə, həm eukaryot həm də prokariotlarda tapılan fotosistemlər iki sıx əlaqəli olan komponentlərdən təşkil olunmuşlar: *reaksiya mərkəzi*, burada bütün ilkin (əsas) proseslər – yüksək-enerjili elektronların yaranması baş verir; *antenna kompleksi* – çoxsaylı zülal komplekslərindən, o cümlədən müvafiq fotosistem daxilində daxili antenna zülallarından və işıq enerjisini tutan və onu reaksiya mərkəzinə ötürən xüsusi (ixtisaslaşmış) zülallardan ibarət olan *işıq-toplayıcı komplekslər* (*LHC*) adlanan xarici antenna kompleksləri (bax Şəkil 12-38).

Həm reaksiya mərkəzi, həm də antennalar möhkəm birləşmiş işıq-udan piqment molekullarına malikdirlər. Fotosintez prosesinə daxil olan əsas piqment xlorofil *a* hər iki reaksiya mərkəzində və antennalarda iştirak edir. Xlorofil *a*-dan başqa antennalar digər işıq-udan piqmentlərə də - vazikulyar (borulu) bitkilərdə *xlorofil b* və həm bitkilərdə həm də fotosintezedici bakteriyalarda olan *karotinoidlərə* malikdirlər. Karotenoidlər uzun, şaxələnmiş, bir-birini əvəz edən birqat və ikiqat rabitəli karbohidrogen zəncirindən təşkil olunublar; onlar quruluşlarına görə, göz kaskadındakı işığı udan retinal piqmentinə çox oxşardırlar (bax Şəkil 15-19). Fərqli dalğa uzunluqlarında işığı udma qabliyyətinə malik olan müxtəlif antenna piqmentlərinin olması udularaq fotosintezdə istifadə edilə bilən işıq spekttlərinin sırasını əhəmiyyətli dərəcədə artırır.

Xlorofil və karotinoidlərin fotosintezdə iştirak etməsini sübut edən ən güclü dəlillərdən biri odur ki, bu piqmentlərin udma spektri fotosintezin təsir spektrinə çox oxşardır (Şəkil 12-40). Sonuncu, işığın müxtəlif dalğa uzunluqlarında fotosintezi təmin edən nisbi qabiliyyətinin ölçüsüdür.

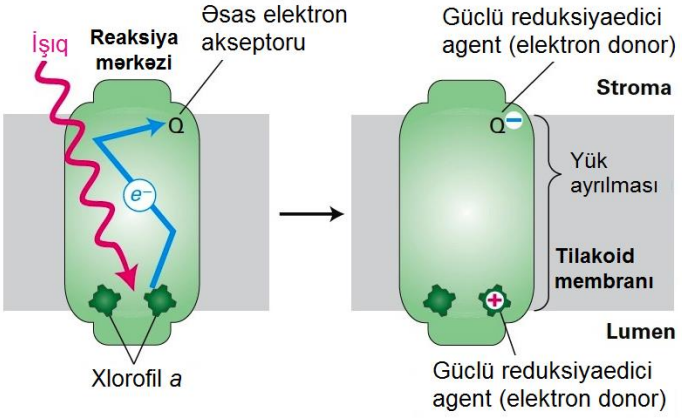
Xlorofil *a* (və ya istənilən başqa molekul) görünən işığı udanda, udulmuş işığın enerjisi xlorofil *a*-da elektronları yüksək-enerjili (həyacanlanmış) vəziyyətə qaldırır. Bu vəziyyət molekuluin həyacanlanmamış əsas vəziyyətindən elektronların porfirin halqasında əsasən C və N atomları ətrafında paylanmasına görə fərqlənir. Həyacanlanmış vəziyyət qeyri stabildir və elektronlar bir sıra rəqabətdə olan proseslər vasitəsilə ilkin vəziyyətinə qayıdırlar. Etanol kimi üzvi həlledicilərdə həll edilmiş xlorofil *a* molekulları üçün həyacanlanmış vəziyyətin enerjisini dağıdan (səpən) əsas reaksiya işığın emissiyası (fluoressensiya və fosforessensiyası) və termal emissiyasıdır (istilik). Amma, eyni xlorofil *a* reaksiya mərkəzinin unikal zülal mühitində birləşən vziyyətdə həyacanlanmış enerjinin dağıdılması kifayət qədər fərqli proseslərlə baş verir, bu da fotosintez üçün həlledicidir.



EKSPERİMENTAL ŞƏKİL 12-40 Fotosintezin sürəti bitkinin üç piqmenti tərəfindən udulan işığın dalğa uzunluqlarında ən yüksək olur. Bitkilərdə fotosintezin təsir spektri (fərqli dalğa uzunluğunda işığın fotosintezi nisbi təmin etmə qabliyyəti) qara rəngdə göstərilmişdir. İşığın enerjisi o yalnız xloroplastlardakı piqmentlər tərəfindən udularkən ATP-yə çevrilə bilir. Bitki fotosistemlərində antennada olan üç fotosintetik piqment üçün udma spektri (fərqli dalğa uzunluqlarında işığın nə qədər yaxşı udulmasını göstərən) rəngli göstərilmişdir. Fotosintezin təsir spektrinin bu piqmentlərin fərdi udma spektri ilə müqayisəsi göstərir ki, fotosintez 680 nm-də əsasən xlorofil ***a*** tərəfindən udulan işığın hesabına, 650 nm-də isə xlorofil ***b*** tərəfindən udulan işığın hesabınadır, daha qısa dalğa uzunluqlarında isə ***a*** və ***b*** xlorofillər və β-karotin daxil olmaqla karotinoidlər tərəfindən udulan işığın hesabınadır.

Reaksiya-Mərkəzində Fəallaşmış Xlorofil *a*-dan Fotoelektron Daşınması Yük Ayrılmasını Əmələ Gətirir

Reaksiya mərkəzi daxilundə xüsusi cütləşmiş xlorofillər hesab edilən, iki çox yaxın (bitişik) xlorofil ***a*** molekulu tilakoid membranın lümen səthinə yaxın yerləşir (Şəkil 12-41). Təxminən 680 nm dalğa uzunluqlu işıq fotonun reaksiya mərkəzindəki bu iki xlorofil *a* molekulunun biri tərəfindən udulması bu xlorofil molekulunun enerjisini 42 kkal/mol artırır (birinci həyacanlanma vəziyyəti). Bu həyacanlanmış molekul bitkilərin reaksiya mərkəzində sürətlə elektronu yaxındakı xlorofilə verir, o isə elektronu aralıq akseptorlar sırasına ötürür. Bu üsulla elektron sürətlə tilakoid membranında stroma səthinə yaxın olan ilkin, əsas elektron akseptoruna, Q xinona keçir. **Fotoelektron daşınması** adlanan, işıqla idarə olunan bu elektron keçirilməsi reaksiya mərkəzi daxilində həm xlorofilin həm də akseptorun unikal mühitindən asılıdır. Demək olar ki, hər dəfə foton udularkən baş verən bu fotoelektron daşınması tilakoid membranın lümen səthi yaxınlığında (stromadan əks tərəfə) xlorofil *a*-da müsbət yükü saxlayır və stroma səthi yaxınlığında reduksiya olunmuş, mənfi yüklənmiş akseptoru (Q^{-}) yaradır.



ŞƏKİL 12-41 Fotosintezin ilkin prosesləri, fotoelektron nəqliyyatı. İşıq fotonu udulduqdan sonra, reaksiya mərkəzində həyacanlanmış xüsisi cüt xlorofil *a* molekulunun biri (*solda*), bir sıra aralıq vasitəçilərlə (göstərilmir) elektronu tilakoid membranın stroma səthində zəif birləşmiş akseptor molekuluna, Q xinonuna verir və membranda mahiyyətcə dönməz olan yük ayrılmasını əmələ gətirir (*sağda*). Bu elektronun sonrakı köçürülmələri, ATP və NADPH əmələ gəlməsində istifadə olunan enerjini buraxır (Şəkil 12-43 və 12-44). İşıqla-həyacanlanmış elektron Q-ə keçəndə yaranan müsbət yüklənmiş xlorofil a^{+} başqa elektronun xlorofil a^{+}-a ilə köçürülməsi nəticəsində sonda neytrallaşır. Bitkilərdə H_2O-un O_2-ə oksidləşməsi bu neytrallaşdırıcı elektronu təmin edir və bu proses, fotosystem II adlanan multizülal kompleksində baş verir (Şəkil 12-44). Fotosistem I kompleksi oxşar elektron nəqliyyat yolunu istifadə edir, amma o, xlorofil a^{+}-da müsbət yükü neytrallaşdırmaq üçün elektronu oksidləşən suyun əvəzinə plastosianin adlanan zülal daşıyıcıdan alır (Şəkil 12-44).

Fotoelektron nəqliyyatı tərəfindən yaradılan Q^{-} çox güclü reduksiyaedici agentdir və elektronları, sonda $NADP^{+}$ olmaqla başqa molekula keçirməyə çox güclü meyillidir. Güclü oksidləşdirici agent olan müsbət yüklənmiş xlorofil a^{+}, orjinal xlorofil *a*-nı regenerasiya etmək üçün lümen səthindəki elektron donorlarından elekltronu cəzb edir. Bitkilərdə, dörd xlorofil a^{+} molekulunun oksidləşdirici gücü aralıq vasitəçilər (mediatorlar) vasitəsi ilə, lümen səthindəki sayta birləşmiş iki su molekulundan ($2H_2O$) dörd elektronu ayırmaq və O_2 əmələ gətirmək üçün istifadə olunur:

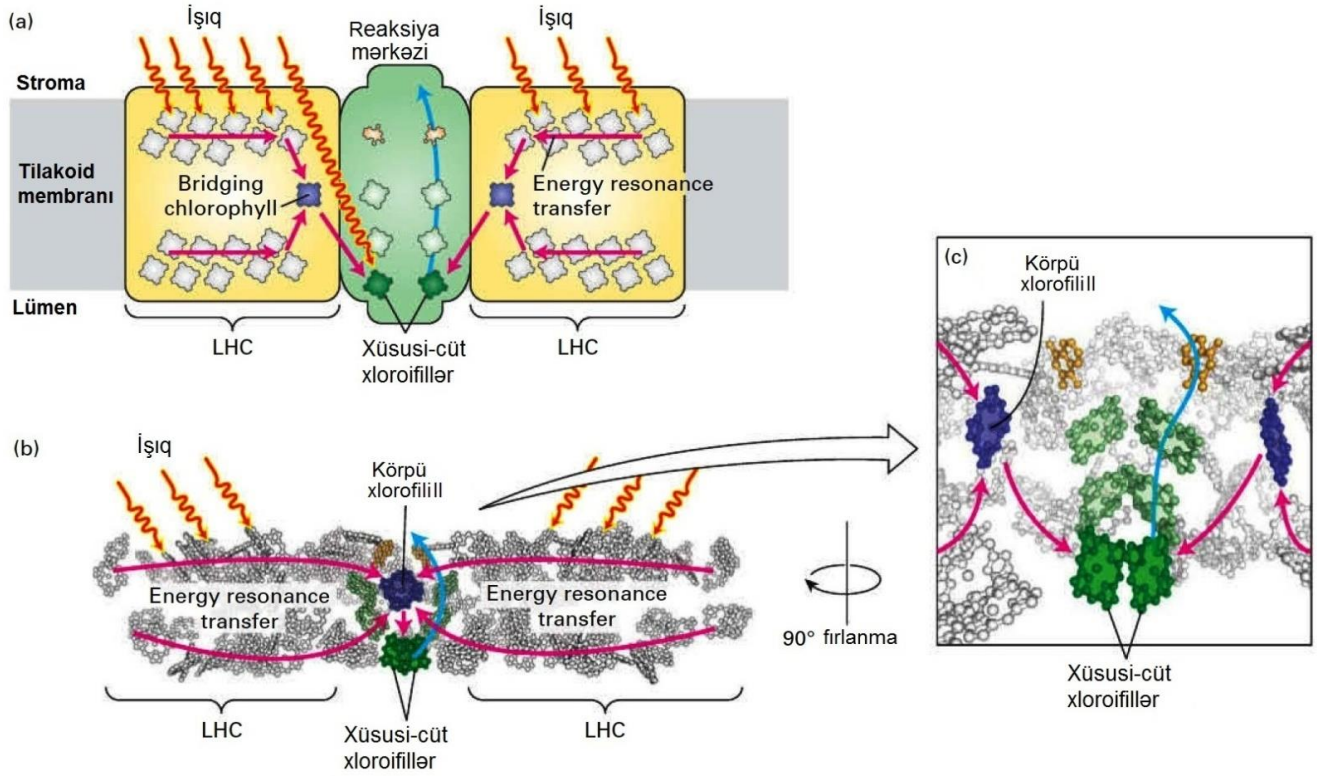
$$2\ H_2O + 4\ \text{xlorofil}\ a^+ \rightarrow 4\ H^+ + O_2 + 4\ \text{xlorofil}\ a$$

Bu güclü bioloji reduksiyaedicilər və oksidləşdiricilər fotosintezin bütün sonrakı reaksiyalarını: elektron daşınması (mərhələ 2), ATP sintezi (mərhələ 3) və CO_2 fiksasiyasını (mərhələ 4) aparmaq üçün lazım olan bütün enerjini təmin edirlər.

Xlorofil *a* həmçinin 680 nm-dən qısa olan diskret dalğa uzunluqlarında olan işığı da udur (bax Şəkil 12-40). Belə udma, molekulu bir sıra həyacanlanma vəziyyətlərindən birinə keçirir, hansıki bu vəziyyətin enerjisi yuxarıda təsvir olunan birinci həyacanlanma vəziyyətinin enerjisindən yüksəkdir və 2×10^{-12} saniyə (2 pikosaniyə, ps) müddətində enerjini buraxaraq aşağı-enerjili birinci həyacanlanma vəziyyətinə qədər dağılır və artıq enerji istilik şəkilində itirilir. Fotoelektron nəqliyyatı və nəticədə yaranan yük ayrılması yalnız reaksiya mərkəzindəki xlorofil *a*-nın birinci həyacanlanma vəziyyətində baş verdiyindən, kvant çıxımı — hər udulan fotona görə fotosintezin miqdarı 680 nm-dən qısa dalğa uzunluqlarında (ona görə də yüksək enerjili) görünən bütün işıq dalğalarında eynidir. İşığın dalğa uzunluqlarının piqmentin udma spektri ilə necə yaxından uyğun olması fotonun udula biləcəyi ehtimalın yüksək olmasını müəyyənləşdirir. Udulduqdan sonra, fotonun dəqiq dalğa uzunluğu xlorofil *a*-nın birinci həyacanlanma vəziyyətinə qalxmasına imkan verən kifayət qədər energetik olması şərti ilə kritik əhəmiyyətli deyil.

Daxili Antenna və İşıq-Toplayıcı Komplekslər Fotosintezin Səmərəliliyini Artırır

Baxmayaraq ki, reaksiya mərkəzi daxilində xlorofil *a*-nın xüsusi cütü yük ayrılmasında və elektron nəqliyyatında birbaşa iştirak edirlər, işığı birbaşa udmaq və fotosintezi inisiasiya etmək qabliyyətinə qadirdirlər, onlar hər şeydən əvvəl, başqa işıq-udan və enerji-ötürən piqmentlər tərəfindən onlara ötürülən enerji ilə dolayı yolla gərginlik altında olurlar. Digər xlorofil molekullarının daxil olduğu bu başqa piqmentlər reaksiya mərkəzində fotonların udulmasında və enerjinin xlorofil *a*-nın xüsusi cütünə ötürülməsində iştirak edirlər (Şəkil 12-42). Bu piqmentlərdən bəziləri fotosistemin daxili komponentləri hesab edilən zülal subvahidləri ilə birləşmiş vəziyyətdədirlər, ona görə də *daxili antennalar* hesab edilirlər. Digərləri, fotosistemlərin özək zülallarına birləşən, amma onlardan fərqlənən zülal komplekslərinə birləşmişlər və bunlar *işıq-toplayıcı komplekslər* (*LHC*) adlanırlar. Hətta fotosintetik orqanizmlərin qarşılaşdığı



ŞƏKİL 12-42 Sianobakteriyalarda və bitkilərdə işıq-toplayan kompleks və fotosistemlər. (a) Sianobakteriyanın membranının diaqramı, burada hər bir multizülal işıq-toplayan kompleks (LHC) 90 xlorofil molekuluna (yaşıl) və 31 dıgər kiçik molekullara malikdir, onların hamısı optimal işıq udulması və enerji ötürülməsi üçün spesifik geometrik düzülüşdədirlər. Reaksiya mərkəzində altı xlorofil molekulundan ikisi xüsusi-cüt xloroiflləri əmələ gətirir, bunlar həyacanlananda fotoelektron daşınmasını inisiasiya edirlər (mavi ox). Enerjinin rezonans ötürülməsi (qırmızı oxlar) udulan işıq enerjisini sürətlə "körpü" ("bridging") xlorofilindən birinə (tünd yaşıl kvadratlar) və oradan reaksiya mərkəzindəki xlorofillərə ötürür. (b) *Pisum sativum*-da (baxça noxudunda) I fotosistemin (PSI) və onunla assosasiyada olan LHC-lərin rentgen-kristalloqrafiya ilə müəyyən edilmiş üç-ölçülü təşkilinin membran müstəvisindən görünüşü. Yalnız xlorofillər və reaksiya-mərkəzinin elektron daşıyıcıları göstərilir. (c) Reaksiya mərkəzinin (b)-dəki böyüdülmüş görünüşü, şaquli ox ətrafında 90° fırlanmışdır. Bax W. Kühlbrandt, 2001, *Nature* **411**:896 və P.Jordan et al., 2001, *Nature* **411**:909. [(b) və (c) hissələri A. Ben-Sham et al., 2003, *Nature* **426**:639; PDB ID 1qvz; and Y. Mazor, A. Borovikova, and N. Nelson, 2015, *Elife* **4**:e07433, PDB ID 4y28.]

maksimum işıq intensivliyində (tropik günorta günəş işığında) reaksiya mərkəzində olan hər bir xlorofil *a* molekulu saniyədə yalnız bir foton udur, bu da fotosintezi bitkilərin tələbatına uyğun olaraq təmin etmək üçün kifayət etmir. Təbii antennaların və LHC-lərin cəlb olunması, xüsusən də, daha çox tipik işıq intensivliklərində 680 nm-lik işığın udulmasını artırmaqla və başqa antenna piqmentləri tərəfindən udula bilən fərqli dalğa uzunluqları sırasının genişləndirilməsi fotosintezin səmərəliliyini artırır. Fotosistemin əsas (özək) zülalları və LHC zülalları piqment molekullarını elə dəqiq orientasiyada və mövqedə saxlayırlar ki, assosasiya etdikləri reaksiya mərkəzində xüsusi xlorofil ***a*** molekulu cütlərindən birinə *rezonans ötürülmə* adlanan, işığın udulması və enerjinin sürətli ötürülməsi ($<10^{-9}$ saniyə müddətində) üçün optimal olsun. Rezonans enerji ötürülməsnə elektronların ötürülməsi daxil deyil. Sianobakteriyaların toxumla çoxalan çoxhüceyrəli bitkilərdəkinə oxşar olan iki fotosistemindən birinin üzərində aparılan tədqiqatlar göstərdi ki, udulan işıqdan enerji əvvəlcə hər bir LHC-dəki "körpü" ("bridging") xlorofilinə istiqamətləndirilir, sonra isə reaksiya mərkəzindəki xüsusi xlorofil-cütünə ötürülür (Şəkil 12-42a). Amma, təccüblüdür ki, bitkilərdə və sianobakteriyalarda LHC-lərin molekulyar quruluşu yaşıl və purpur bakteriyalardakından tamamilə fərqlənir, hərçənd ki, hər iki tip karotinoidlərə və xlorofillərə malikdirlər. Şəkil 12-42b, *Pisum sativum*-da (baxça noxudu) fotosistem I-də xlorofil piqmentlərinin periferial LHC antennadakılarla birlikdə paylanmasını göstərir. Reaksiya mərkəzini əhatə edən böyük miqdarda daxili və LHC antenna xlorofilləri udulmuş işıq enerjisinin reaksiya mərkəzində xlorofillərin xüsusi-cütlərinə səmərəli şəkildə ötürülməsinə imkan verirlər.

Baxmayaraq ki, LHC antenna xlorofilləri fotonlardan udulmuiş işıq enerjisini ötürə bilirlər, onlar elektronları buraxa bimirlər. Artıq bizim gördüyümüz kimi, bu funksiya iki reaksiya mərkəzi xlorofillərində olur. Onların elektron-buraxma qabliyyətini anlamaq üçün növbəti bölmədə bakterial və bitki fotosistemlərində reaksiya mərkəzinin quruluşunu və fəaliyyətini öyrənəcəyik.

12.6 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Fotosintez və İşıq-Udan Piqmentlər

- Bitkilərdə fotosintezin əsas son məhsulları molekulyar oksigen və altı-karbonlu şəkərlərin polimerləridir (nişasta və saxaroza).
- Fotosintezdə işığın-tutulması və ATP-yaradılması reaksiyaları xloroplastlar daxilində yerləşən tilakoid membranlarında baş verir. Xloroplastları əhatə edən, keçirici olan xarici membran və daxili membran fotosintezdə bilavasitə iştirak etmirlər (bax Şəkil 12-37).
- Fotosintezin dörd mərhələsi vardır: (1) işığın udulması, yüksək-enerjili elektronların yaranması və H_2O-dan O_2-nin əmələ gəlməsi; (2) $NADP^+$-ın NADPH-a reduksiya olunmasına səbəb olan elektron nəqliyyatı və proton-hərəkətverici qüvvənin yaranması; (3) ATP-in sintezi; (4) CO_2-nin karbohidratlara çevrilməsi (karbonun fiksasiyası).
- Fotosintezin 1-ci mərhələsində işıq enerjisi, tilkoid membranlarında reaksiya mərkəzinin zülallarına birləşmiş iki "xüsusi-cüt" xlorofil *a* molekullarının biri tərəfindən udulur. Həyacanlanmış xlorofil aralıq vasirtəçilərlə öz elektronunu membranın əks tərəfində olan xinona verir və yüklərin ayrılmasını əmələ gətirir (bax Şəkil 12-41). Yaşıl bitkilərdə, müsbət yüklənmiş xlorofillər sonra elektronları sudan ayırır və molekulyar oksigeni (O_2) əmələ gətirir.
- 2-ci mərhələdə, elektronlar reduksiya olunmuş xinondan tilakoid membranında daşıyıcılar vasitəsi ilə sonuncu elektron akseptoruna, adətən $NADP^+$-a çatana qədər daşınır və onu NADPH-a reduksiya edir. Elektron nəqliyyatı protonların membranda stromadan tilakoid lümeninə hərəkəti ilə birləşərək tilakoid membranında pH qradientini (proton-hərəkətverici qüvvəni) yaradır.
- 3-cü mərhələdə, protonların elektrokimyəvi qradientinin azalan istiqamətində F_0F_1 kompleksi (ATP sintaza) vasitəsi ilə hərəkəti ADP və P_i-dan ATP sintezini aparır.
- 4-cü mərhələdə, 2-ci və 3-cü mərhələlərdə yaranan NADPH və ATP, karbohidratların sintezi ilə nəticələnən CO_2 fiksasiyası üçün lazım olan enerjini və elektronları təmin edirlər. Bu reaksiyalar tilakoid stromasında və sitozolda baş verir.
- Hər bir reaksiya mərkəzi ilə assosasiyada olan çoxsaylı daxili antennalar və işıq-toplayan komplekslər (LHC-lər) xlorofil *a* və *b*-yə, karotinoidlərə və çoxsaylı dalğa uzunluqlarında işığı udan digər piqmentlərə malikdirlər. Daxili antennaların və LHC-in xlorofil molekullarından raeksiya mərkəzində xlorofillərin xüsusi-cütünə rezonans enerji ötürülməsi yolu ilə elektron deyil yalnız enerji ötürülür (bax Şəkil 12-42).

12.7 Fotosistemlərin Molekulyar Analizi

Əvvəlki bölmədə qeyd olunduğu kimi, fotosintez yaşıl və purpur bakteriyalarda oksigen əmələ gətirmədiyi halda, fotosintez sianobakteriyalarda, yosunlarda və ali bitkilərdə əmələ gətirir*. Bu fərq, sonuncu orqanizmlərdə iki tip fotosistemin (PS) mövcud olmasına aid edilə bilər: PSI $NADP^+$-i NADPH-a reduksiya edir və PSII H_2O-dan O_2-ni əmələ gətirir. Əksinə, yaşıl və purpur bakteriyalar yalnız bir tip fotosistemə malikdirlər, o da O_2-ni əmələ gətirə bilmir. Biz əvvəlcə purpur bakteriyaların ən sadə fotosistemini müzakirə edəcəyik, sonra isə, daha mürəkkəb olan xloroplastların fotosintezedici maşınını nəzərdən keçirəcəyik.

Purpur Bakteriyaların Tək Bir Fotosistemi Proton-hərəkətverici Qüvvəni Yaradır Amma O_2 Yox

Purpur bakteriyalarda plazma membranında yerləşən fotosistemdəki yük ayrılması mexanizmi (Şəkil 12-43) öncə qeyd olunmuş bitkilərdəkinə identikdir. Reaksiya mərkəzi zülalı

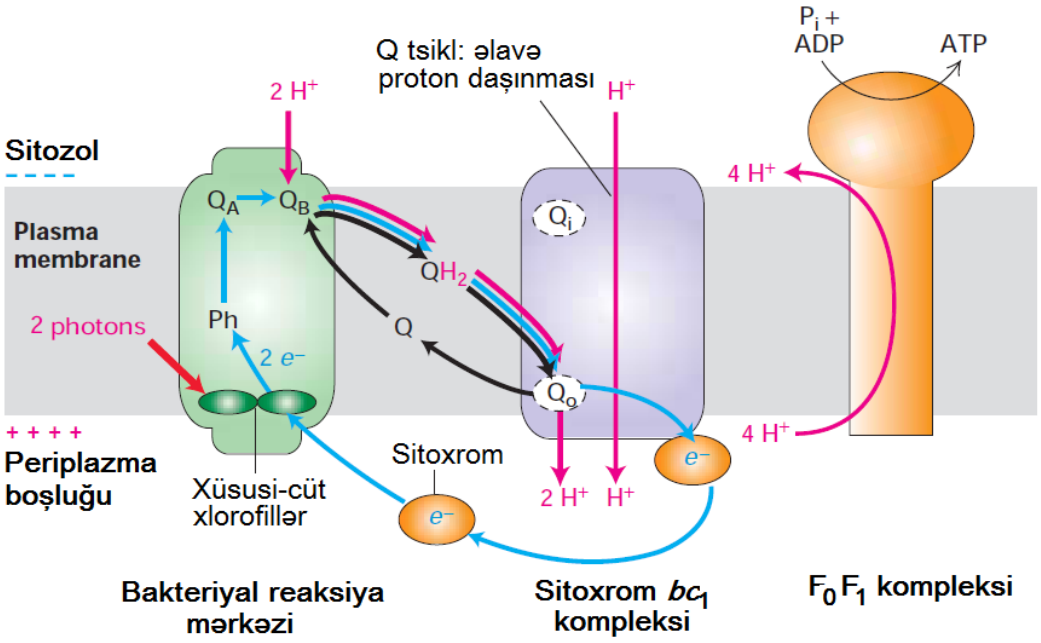
*Yalnız müəyyən arxaelarda baş verən, işıq enerjisini toplamaq üçün istifadə olunan çox fərqli mexanizm tipi burada müzakirə olunmur, çünki o, burada müzakirə olunan reaksiya mərkəzi mexanizmlərindən çox fərqlidir. Bu başqa mexanizmdə, işıq fotonunu udan, bakteriorodopsin adlanan plazma-membranı zülalı hər udulan fotona uyğun olaraq bir protonu sitozoldan hüceyrəxarici boşluğa vurur.

fotosintez zamanı işığı udan və elektronları daşıyan prostetik qruplara malikdir. Bu prostetik qruplara, bitkilərdə reaksiya mərkəzindəki xlorofil ***a*** molekullarının ekvivalenti olan bakterioxlorofil ***a*** molekullarının "xüsusi-cütü", eləcə də başqa piqmentlər və Q_A və Q_B kimi adlandırılan və quruluşuna görə mitoxondrial ubixinona çox oxşar olan iki xinon daxildirlər. Udulan işığın enerjisi reaksiya mərkəzinin bakterioxlorofil ***a*** molekulundan elektronun qoparılmasında və bir sıra müxtəlif piqmentlər vasitəsilə, 4 və 200 pikosüaniyə arasında baş verən reaksiyalar sırası ilə Q_A-ya ötürülməsində istifadə olunur. Sonra elektronlar yavaş sürətlə, 200 mikrosaniyə (μs) sürətilə Q_A-dan əsas elektron akseptoruna, membranın sitozol üzündəki sayta zəif birləşmiş Q_B-yə ötürülür. Beləliklə, xlorofil müsbət yükü alır, Q_B isə mənfi yüklənir.

Əsas elektron akseptorundan sonra, bakterial reaksiya-mərkəzində Q_B bir elektronu qəbul edib $Q_B^{\bullet-}$ əmələ gətirir, o ikinci elektronu eyni reaksiya-mərkəzi xlorofilindən qəbul edir və yenidən həyacanlanır (məsələn, ikinci fotonu qəbul etməklə və ya antenna molekullarından enerjini ötürməklə). Sonra xinon sitozoldan iki protonu birləşdirir, reduksiya olunmuş xinonu (QH_2) əmələ gətirir və reaksiya mərkəzindən buraxılır (bax Şəkil 12-43). QH_2 bakterial membran daxilində sitoxrom bc_1 elektron nəqliyyat kompleksinin eqzoplazmatik səthində Q_o mərkəzinə diffuziya edir, bu elektron nəqliyyat kompleksi quruluşuna görə mitoxondridəki III kompleksə oxşardır. Orada o, özünün iki protonunu periplazma boşluğuna (plazma membranla bakteriya hüceyrə divarı arasındakı boşluq) buraxır Bu proses protonları sitozoldan hüceyrə xaricinə ötürür və hüceyrə membranında proton-hərəkətverici qüvvəni yaradır. Eyni zamanda, QH_2 öz iki elektronunu buraxır, və bu elektronlar eynilə Şəkil 12-24-də mitoxondrial kompleks III-də ($CoQH_2$-sitoxrom *c* reduktaza) təsvir olunduğu kimi, sitoxrom bc_1 kompleksindən keçərək hərəkət edir. Bakterial reaksiya mərkəzində Q tsikl, mitoxondridəki Q tsikl kimi əlavə protonları sitozoldan membranlararası periplazma boşluğuna vurur, bununla da proton-hərəkətverici qüvvəni artırır.

Reaksiya mərkəzindən və sitoxrom bc_1 kompleksindən ötürülən elektronlar üçün akseptor peroplazma boşluğunda Fe^{3+} vəziyyətindən Fe^{2+} vəziyyətə reduksiya edilmiş bir-elektronlu daşıyıcı, həllolan *sitoxromd*ur (Şəkil 12-43). İkinci sitoxrom (mitoxondridəki sitoxrom *c*-yə analoji olan) sonra reaksiya mərkəzinə diffuziya edir, o öz elektronunu burada müsbət yüklənmiş xlorofil a^+-ya buraxır, və onu yüklənməmiş ilkin vəziyyətinə qaytarır, sitoxrom isə Fe^{3+} vəziyyəinə qayıdır. *Tsiklik* elektron axını oksigeni və reduksiya olunmuş koenzimləri əmələ gətirmir, amma o, proton-hərəkətverici qüvvəni yaradır.

Başqa sistemlərdə olduğu kimi, bu proton-hərəkətverici qüvvə, bakteriyal plazma membranında yerləşən F_0F_1 kompleks tərəfindən ATP sintez etmək üçün və membranda molekulların qatılıq qradientlərinə qarşı daşınması üçün istifadə olunur.



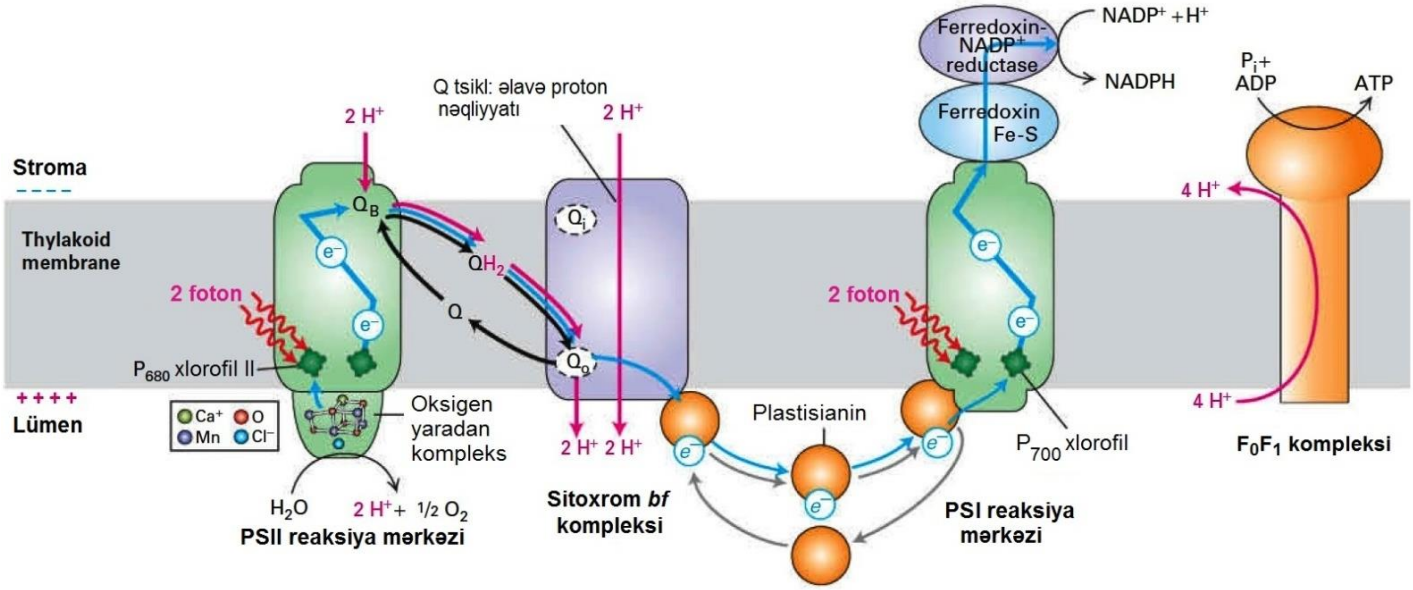
ŞƏKİL 12-43 Purpur bakteriyaların tək fotosistemində tsiklik elektron axını. Tsiklik elektron axını proton-hərəkətverici qüvvəni yaradır, amma O_2 yaratmır. Mavi oxlar elektron axınını göstərir, qırmızı oxlar proton hərəkətini göstərir. (*Solda*) Birbaşa işıqdan udulan enerji və ya assosasiyada olan LHC-dən gələn enerji (burada göstərilmir) reaksiya mərkəzində xüsusi-cüt xlorofillərdən birini həyacanlandırır. Həyacanlanmış xlorofildən aksessor xlorofil vasitəsilə fotoelektron feofitinə (Ph) və xinon A-ya (Q_A), sonra da xinon B-yə (Q_B) daşınır , xinon B semixinonu $Q^{\bullet-}$ yaradır və müsbət yükü xlorofildə saxlayır. İkinci fotonun udulmasının və ikinci elektronun semixinona ötürülməsinin ardınca xinon sürətlə sitozoldan iki protonu götürür və QH_2 yaradır. (*Ortada*) Membrandan diffuziya etdikdən və sitoxrom bc_1 kompleksinin periplazma (eqzoplazmatik) üzündə Q_o mərkəzə birləşdikdən sonra, QH_2 iki elektronu verir və eyni zamanda iki protonu periplazma boşluğunda xarici mühitə buraxır, ATP sintezini aparan proton elektrokimyəvi qradientini (proton-hərəkətveric qüvvəni) yaradır. Elektronlar, periplazmatik boşluğa diffuziya edən, həllolan sitoxromla geriyə, reaksiya-mərkəzi xlorofilinə daşınırlar. Elektronların tsiklik yoluna (mavi) diqqət yetirək. Sitoxrom bc_1 kompleksdə Q tsiklin fəaliyyəti, mitoxondrilərdə olduğu kimi, əlavə protonları membrandan xarici mühitə vurur. Bax J. Deisenhofer and H. Michael, 1991, *Ann. Rev. Cell Biol.* **7**:1.]

Xloroplastlar Fəaliyyətinə və Məkanına Görə İki Fərqli Fotosistemlərə Malikdirlər

1940-cı illərdə, biofizik R.Emerson aşkar etdi ki, bitkilərdə 700 nm dalğa uzunluqlu işıqla əmələ gələn fotosintezin sürəti qısa dalğalı (yüksək enerjili) işığı əlavə etməklə güclü şəkildə artırıla bilər. O tapdı ki, işığın, məsələn deyək ki, 600-dən 700 nm qədər kombinasiyası, ayrılıqda bu iki dalğa uzunluğunun sürətinin cəminə nisbətən fotosintüzin daha yüksək sürətini təmin edir. *Emerson effekti* adlanan bu təsir tədqiqatçıların belə bir nəticəyə gəlməsinə səbəb oldu ki, bitkilərdə fotosintezdə iki ayrı fotosistemin, PSI və PSII-nin qarşılıqlı təsiri iştirak edir. PSI 700 nm və ya uzun dalğa uzunluqlu işıqla idarə olunur; amma, PSII yalnız qısa dalğa uzunluqlu (<680 nm) işıqla idarə olunur.

Xloroplastlarda, PSI və PSII-də fotoelektron daşınmasını inisiasiya edən xüsusi cüt reaksiya-mərkəzinin xlorofilləri əhatə olunduqları zülal mühitinə görə işıq udma maksimumu ilə fərqlənirlər. Bu səbəbdən də, bu xlorofillər çox zaman P_{680} (PSII) və P_{700} (PSI) kimi işarələnirlər. Bakterial reaksiya mərkəzlərində olduğu kimi, xloroplastların hər bir reaksiya mərkəzi çoxsaylı daxili antennalarla və işıq toplayan komplekslərlə (LHC) bağlı olur; PSII və PSI ilə əlaqəli olan LHC-lər (uyğun olaraq LHCII və LHCI) fərqli zülallara malikdirlər. Bundan başqa, bu iki fotosistem tilakoid membranda fərqli paylanıblar: PSII əsasən üst-üstə düzülmüş (qranalarda, bax Şəkil 12-37) rayonlarda, PSI isə əsasən qranalardan kənar rayonlarda paylanırlar. Tilakoid membranın üst-üstə düzülməsi (stacked) ola bilsin ki, PSII ilə, xüsusən də LCHII ilə əlaqəli zülalların birləşmə xassəsi ilə bağlıdır.

Nəhayət sonuncu və ən əhamiyyətlisi odur ki, bu iki xloroplast fotosistemləri fəaliyyətlərinə görə də əhəmiyyətli dərəcədə fərqlənirlər (Şəkil 12-44): yalnız PSII suyu oksidləşdirərək molekulyar oksigeni (O_2) əmələ gətirdiyi halda PSI elektronu son akseptora $NADP^+$ ötürür. Xloroplastlarda fotosintez xətti və tsiklik yolla gedə bilir. Bizim birinci müzakirə etdiyimiz xətti yol həm karbon fiksasiyasını həm də ATP sintezini təmin edir. Tsiklik yol isə əksinə, yalnız ATP sintezini təmin edir və karbon fiksasiyası üçün istifadə olunan reduksiya olunmamış NADPH əmələ gətirirmir. Fotosintezedici yosunlar və sianobakteriyalar, xloroplastlarda olan fotosistemlərə analoji olaraq iki fotosistemə malikdirlər. Bitkilərin I və II fotosistemlərini və fotosintezedici bakteriyaların fotosistemini oxşar zülallar və piqmentlər təşkil edirlər.



ŞƏKİL 12-44 Bitkilərdə xətti elektron axını hər iki xloroplast fotosistemini, PSI və PSII-ni tələb edir. Mavi oxlar elektronların axmasını göstərir; qırmızı oxlar protonların hərəkətini göstərir. LHC-lər göstərilmir. (*Solda*) PSII reaksiya mərkəzində, eyni P_{680} xlorofilində iki ardıcıl işıqla-indiksiya olunan həyacanlanma əsas elektron akseptoru Q_B-nin QH_2-ə reduksiya olunması ilə nəticələnir. PSII-nin lümen tərəfində, oksigen yaradan kompleks tərəfindən H_2O-dan çıxarılmış elektronlar P_{680}^+-a keçirilir, hər bir həyacanlanmadan sonra reaksiya mərkəzi xlorofilləri ilkin vəziyyətə qaytarılır. Oksigen əmələ gətirən kompleks dörd manqan (Mn, bənövşəyi) ionlarının, Ca^{2+} ionunun (yaşıl) və Cl^- ionunun (teal – yaşıla bənzər rəng) klasterinə malikdir. Bu birləşmiş ionlar suyun parçalanmasında fəaliyyət göstərir və O_2 əmələ gəlməsi üçün vacib mühiti yaradırlar. P_{680}-in işıqla-induksiya olunan dörd ardıcıl həyacanlanması (burada göstərilən saydan iki dəfə artıq) iki su molekulunu oksidləşdirmək və dörd protonu və bir molekul molekulyar oksigeni (O_2) azad etmək üçün tələb olunur. Zülaldakı tirozin qalığı elektronların Mn ionlarından oksidləşmiş reaksiya-mərkəzi xlorofilinə (P_{680}^+) keçməsinə kömək edir, hər bir fotonun həyacanlanmasından sonra onu əvvəlki vəziyyətinə (P_{680}) reduksiya edir. (*Mərkəzdə*) Sonra, sitoxrom *bf* kompleksi QH_2-dən elektronları qəbul edir və iki protonu lumen daxilinə daşıyır. Sitoxrom *bf* kompleksində Q tsiklinin fəaliyyəti əlavə protonları membrandan tilakoid lümeninə translokasiya edir və proton-hərəkətverici qüvvəni artırır. (*Sağda*) PSI reaksiya mərkəzində, işıqla-həyacanlanan P_{700} xlorofillərindən ayrılan hər bir elektron reaksiya mərkəzində müxtəlif daşıyıcılarla hərəkət edərək stroma səthinə keçir, burada həllolan ferredoksin (Fe-S zülal) elektronu ferredokdin-$NADP^+$ reduktazaya (FNR) keçirir. Bu ferment, $NADP^+$ reduksiya etmək üçün prostetik qrup kimi flavin adenin dinukleotidi (FAD) və protonu istifadə edir və onu NADPH-a çevirir. P_{700}^+, sitoxrom *bf* kompleksi və həllolan elektron daşıyıcısı plastosianin vasitəsi ilə PSII-dən daşınan elektronu əlavə etməklə öz əvvəlki, əsas vəziyyətinə qaytarılır.

Bitkilərin Hər İki Fotosistemindən Keçən Xətti Elektron Axını, Proton-Hərəkətverici Qüvvəni, O_2 və NADPH Yaradır

Xloroplastlarda xətti elektron axınına elektronların H_2O-dan $NADP^+$-a keçirildiyi məcburi (obliqat) sıraya PSII və PSI daxildir (bax Şəkil 12-44). Proses fotonun PSII tərəfindən udulması ilə başlayır və elektronların P_{680} xlorofil *a*-dan stroma səthində akseptor plastoxinona (Q_B) keçməsinə səbəb olur. Nəticədə əmələ gələn P_{680}^+ bir elektronu nisbətən istəməyən H_2O donordan (relatively unwilling donor H_2O) qoparır, O_2 əmələ gəlməsi üçün aralıq məhsulu və tilakoid lümenində qalan protonu yaradır və proton-hərəkətverici qüvvənin yaranmasına kömək edir. P_{680}^+ ikinci fotonu udduqdan sonra, semixinon $Q^{\bullet-}$ ikinci elektronu qəbul edir və stroma boşluğundan iki protonu götürərək QH_2-ni əmələ gətirir. Membrana diffuziya etdikdən sonra, QH_2, bakteriyal bc_1 kompleksinə və mitoxondrial III kompleksə anoloji olan sitoxrom *bf* kompleksin Q_o mərkəzinə birləşir. Həmin sistemlərdə olduğu kimi, Q tsikli (bax Şəkil 12-24) fəaliyyət göstərərək, elektron-nəqliyyat zənciri ilə yaradılan proton-hərəkətverici qüvvəni artırır. Sitoxrom *bf* kompleksi QH_2-dən elektronları qəbul etdikdən sonra, onları hər dəfə biri olmaqla həllolan elektron daşıyıcı *plastosianinin* (sitoxrom *c*-ə anoloji olan) Cu^{2+} formasına ötürür, onu Cu^{1+} formasına reduksiya edir. Sonra reduksiya olunan plastosianin tilakoid lümeninə diffuziya edir, elektronu PSI-ə daşıyır.

Fotonun PSI tərəfindən udulması elektronun reaksiya mərkəzi xlorofil *a*, P_{700}-dən çıxarılmasına səbəb olur (Şəkil 12-44). Nəticədə əmələ gələn oksidləşmiş P_{700}^+ plastosianinin PSII reaksiya mərkəzindən gələn elektron ilə reduksiya olunur. Yenə də, bu proses mitoxondridəki elektron nəqliyyat zənciri ilə analojidir (bax Şəkil 12-22). Lümen səthində P_{700} tərəfindən qəbul olunan və foton udulması ilə həyacanlanan elektron PSI daxilində bir sıra daşıyıcılar vasitəsi ilə tilakoid membranın stroma səthinə keçir, burada o, dəmir-kükürd (Fe-S) zülalı ferredoksin tərəfindən qəbul olunur. Xətti elektron axınında, PSI-də həyacanlanan elektronlar ferredoksin-$NADP^+$ reduktaza (FNR) vasitəsi ilə ferredoksindən köçürülür. Bu ferment, $NADP^+$-ı reduksiya etmək üçün elektron daşıyıcısı kimi FAD prostetik qrupundan istifadə edir, stromadan götürülmüş bir protonla birlikdə reduksiya olunmuş NADPH əmələ gətirir. İndi artıq xətti elektron axını yolu tamamlanır.

Tilakoid membranında F_0F_1 kompleksi xətti elektron axını zamanı yaranan proton-hərəkətverici qüvvəni membranın stroma tərəfində ATP sintez etmək üçün istifadə edir. Beləliklə bu yol PSII və PSI, həmçinin onların antennaları tərəfindən udulan çoxsaylı fotonlardan alınan enerjini xloroplastın stromasında həm NADPH həm də ATP-nın yaradılması üçün sərf edir, burada onlar CO_2 fiksasiyasında istifadə olunurlar.

Oksigen-Yaradan Kompleks PSII Reaksiya Mərkəzinin Lumen Səthində Yerləşir

PSII reaksiya mərkəzində fotoelektron nəqliyyatı (bax Şəkil 12-44) əvvəldə müzakirə olunan purpur bakteriyaların reaksiya mərkəzinin (bax Şəkil 12-43) fotoelektron nəqliyyatına bənzəyir. PSII <680 nm dalğa uzunluqda fotonla həyacanlananda bu P_{680} xlorofilində bir elektronun itirilməsinə səbəb olur. Bu elektron çox sürətlə xinona (Q_A) daşınır, sonra isə tilakoid membranın xarici (stroma) səthində olan əsas elektron akseptoruna, Q_B-ə daşınır (bax Şəkillər 12-44). Amma, PSII bakterial reaksiya mərkəzindən onunla fərqlənir ki, o əlavə üç zülal subvahidinə, tilakoid lümeninə baxan *oksigen əmələ gətirən kompleksə* malikdir (bu kontekstdə "oksigen-əmələgətirmə" H_2O-dan O_2 əmələ gətirmək deməkdir).

PSII-nin reaksiya-mərkəzinin fotokimyəvi oksidləşmiş xüsusi-cüt xlorofili *a* olan P_{680}^+ məlum olan *ən güclü* bioloji oksidantdır. P_{680}^+-ın reduksiya potensialı H_2O-nun reduksiya potensialına nisbətən daha müsbətdir, beləliklə, o suyu oksidləşdirə, O_2 və H^+ ionlarını yarada bilir. Suyun oksidləşməsi PSII-də P_{680}^+-ın reduksiyası üçün elektronları təmin edir, beləliklə işığın udulması ilə buraxılan elektronları əvəz edir. Oksigen-əmələ gətirən kompleks, H_2O-un O_2-ə çevrilməsində birbaşa iştirak edən, manqan (Mn), kalsium (Ca^{2+}) və oksigen klasterinə (Mn_4CaO_5) malik olan, eləcə də reaksiya sürtətinə təsir edən Cl^- ionlarına malik olan zülaldır (bax Şəkil 12-44). Mn ionları O_2-in yaranması zamanı beş müxtəlif oksidləşmə vəziyyəti ilə dövrə edir. Yaxınlıqdakı tirozin qalığı elektronların H_2O-dan P_{680}^+-a keçirilməsinə kömək edir. H_2O-dan buraxılan protonlar tilakoid lümenində qalırlar. O_2 əmələ gəlməsi üçün iki molekul H_2O oksidləşməsi dörd elektronun ayrılmasını tələb edir, amma hər bir fotonun PSII tərəfindən udulması yalnız bir elektronun ötürülməsi ilə nəticələnir. Beləliklə, tək bir PSII bir O_2 molekulunun əmələ gəlməsi üçün dörd dəfə öz elektronunu itirməli və yenidən oksigen ayıran kompleksi oksidləşdirməlidir. Belə guman olunur ki, oksigen-əmələ gətirən kompleksin zülalındakı kanallar H_2O-un oraya çatdırılması və O_2-in fəal mərkəzdən oksigen-əmələ gətirən kompleksi əhatə edən zülallar vasitəsi ilə çıxarılması üçün boru (kəmər) rolunu oynayır.

Atrazin ABŞ-ın kənd təsərrüfatında alaq otlarının təmizlənməsində ən çox istifadə edilən herbisidlərdən biridir. Atrazin PSII ilə birləşib oksidləşmiş Q_B-nin birləşməsini blok edir və bu yolla elektron daşınmasını dayandırır.

Çoxsaylı Mexanizmlər Hüceyrəni Fotoelektron Daşınması Zamanı Yaranan Reaktiv Oksigen Nümunələrinin Dağıtmasına Qarşı Mühafizə Edirlər

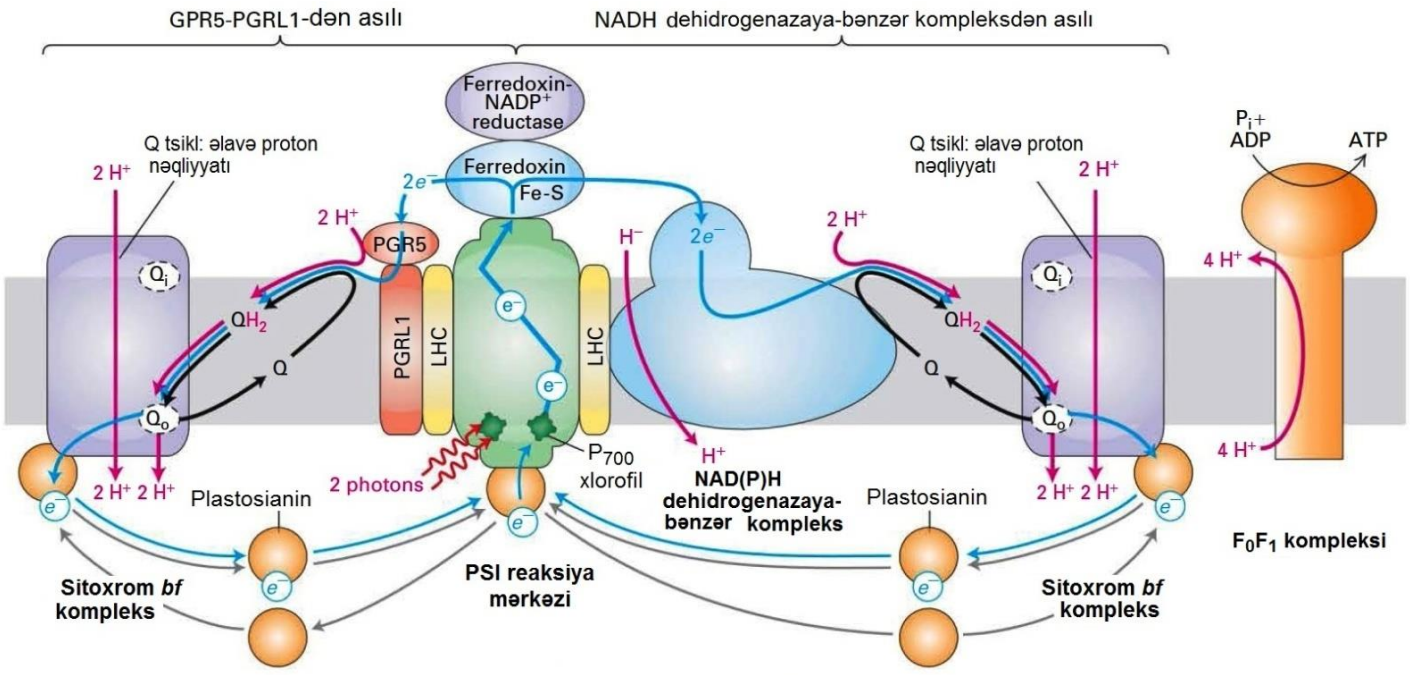
Bizim öncə, mitoxondridə gördüyümüz kimi, elektron nəqliyyat zənciri vasitəsi ilə elektron daşınması zamanı yaranan ROS (bax Şəkil 12-35), həm orqanoid fəaliyyətini tənzimləmək üçün siqnal rolunu oynayır həm də muxtəlif biomolekullarda zədələnməyə səbəb olur. Eyni hal xloroplast üçün də mövcuddur. Məsələn, hidrogen peroksid (H_2O_2) quraqlığa məruz qalmış bitkilərdə dehidrasiyanın qarşısını almaq üçün və tsiklik elektron daşınmasına nəzarət etmək üçün məsamələrdə (stomata) qaz mübadiləsini tənzimləyir, biz bunu tezliklə müzakirə edəcəyik.

PSI və PSII fotosistemlər assosasiyada olduqları öz işıq toplayan kompleksi ilə birlikdə radiant enerjini ATP və NADPH kimi faydalı kimyəvi enerjiyə çevirməkdə əhəmiyyətli dərəcədə səmərəli olsalar da belə, onlar da mükəmməl deyillər. İşığın intensivliyindən və hüceyrənin fizioloji şəraitindən asılı olaraq, işıq toplayıcı antennalarda və reaksiya mərkəzlərində xlorofil tərəfindən udulan, nisbətən kiçik, amma əhəmiyyətli miqdarda enerji xlorofilin "*triplet*" xlorofil adlanan fəal vəziyyətə keçməsinə səbəb olur. Bu vəziyyətdə, xlorofil öz enerjisinin bir hissəsini molekuilyar oksigenə (O_2) verə bilir və onu triplet oksigen ($^3O_2$) adlanan öz normal vəziyyətindən, ilkin qeyri-

reaktiv vəziyyətdən nisbətən yeksək dərəcədə reaktiv olan sinqlet vəziyyət (ROS) formasına $^1O_2$ çevirir. Bu $^1O_2$-lərdən bəziləri xloroplastın metabolik vəziyyəti ilə hüceyrənin qalan hissələri arasında əlaqənin yaranması üçün nüvəyə siqnal verilməsi kimi istifadə oluna bilir. Amma $^1O_2$-lərin əksər hissəsi xüsusi "Scavenger molekullar" vasitəsi ilə reaksiya girib sürətlə söndürülməzsə, o yaxınlıqdakı molekulla reaksiyaya girib onu zədələyəcəkdir. Bu zədələnmə tilakoid fəaliyyətinin səmərəliliyini aşağı salacaq və buna *fotoingibirləşmə* deyilir.

Karotinoidlər (kökə onun narıncı rəngini verən β-karotin də daxil olmaqla doymamış izopren qruplarının polimeri) və α-tokoferol (vitamin E-nin bir forması) bitkini mühafizə etmək üçün $^1O_2$-in sönməsində əhəmiyyətli rol oynayan kiçik hidrofob molekullardır. Məsələn, *Chlamydomanas reinhardtii* birhüceyrəli yaşıl yosununda tokoferolun sintezinin herbisid pirazolinatla ingibirləşməsi yüksək dərəcədə işıqla-induksiya olunan fotoingibirləşməyə səbəb olur. Birbaşa yaxınlqda olarkən çox təhlükəli triplet xlorofillərdən enerjini çox səmərəli şəkildə çəkib çıxaran karotinoid molekulları $^1O_2$ əmələ gəlməsinin qarşısını alan, miqdarca ən əhəmiyyətli molekullardır. Sianobakteriya *Thermosynechococcus elongatus*-da PSII monomerində 35 xlorofilə qarşı təxminən 11 karotinoid molekulu vardır, bu $^1O_2$ karotinoidlər vasitəsilə söndürülməsinin əhəmiyyətini göstərir.

İntensiv işıqlanma altında fotosistem PSII $^1O_2$ yaratmağa xüsusiən meyillidir, amma PSI superoksid, hidrogenperoksid və hidroksil radikalları kimi başqa ROS-ları əmələ gətirir. PSII reaksiya mərkəzinin subvahidlərindın D1 adlanan biri hətta zəif işıq şəraiti altında olduqda belə daimi $^1O_2$ vasitəsi ilə zədələnməyə məruz qalır. Zədələnmiş reaksiya mərkəzi qrandan tilakoidin birqatlı (unstacked) rayonuna keçir, burada D1 subvahid proteazalarla tam parçalanır və yeni sintez olunmuş D1 zülalı ilə əvəz olunur, buna D1 zülalının zədələnməsi-bərpası tsikli deyilir. D1 zülalının sürətlə sintezini tələb edən zədələnmiş D1-in tez şəkildə əvəz olunması PSII-nin fotoingibirləşmədən bərpa olunmasına və fəallığını əhəmiyyətli dərəcədə saxlamasına kömək edir. Zədələnmənin bərpa olunması tsiklinin çox əhəmiyyətli bir komponenti HSP70 ailəsi (bax Fəsil 3) çaperonun HSP70B adlanan nümayəndəsidir. Bu çaperon zədələnmiş PSII-yə birləşir və D1 subvahid əvəz olunarkən kompleksin başqa komponentlərinin itirilməsinə mane olur. Fotoingibirləşmə dərəcəsi HSP70B-in xloroplastlarda mümkün olan miqdarından asılıdır.



ŞƏKİL 12-45 Bitkilərdə, proton-hərəkətverici qüvvə və ATP yaradan amma oksigen və NADPH yaratmayan tsikik elektron axını. Tsiklik elektron daşınmasında işıq enerjisi tsikldə suyu oksidləşdirmədən və ya NADPH yaratmadan ptoton-hətəkətverici qüvvəni və ATP-ni yaratmaq üçün elektronların PSI tərəfindən daşınmasında istifadə olunur. Yüksək-enerjili elektronlar PSI-in ferrodoksini vasitəsilə ya PGR5-PGRL1 heterodimerə (soldakı yol, qırmızı) ya da NADPH dehidrogenazaya-bənzər kompleksə (sağdakı yol, mavi) daşınır, onlar sonra burada, plastoxinonu (Q) QH_2-ə reduksiya edir. Bu iki elektron akseptorunun hər biri işıq toplayan kompleksin (LHC) subvahidləri (sarı) vasitəsilə PSI ilə müstəqil superkompleks əmələ gətirir. (PGR5-PGRL1 heterodimer və NADH dehiodrogenazaya-bənzər kompleks eyni superkompleksdə birlikdə tapılmamışlar, amma burada tsiklik elektron axınının iki mexanizminin oxşarlığını göstərmək üçün onlar birlikdə yalnız bir PSI ilə çəkilmişlər.) Sonra QH_2 elektronları sitoxrom *bf* kompleksə, ondan sonra plastosianinə və nəhayət sonda, xətti elektron axını yolunda olduğu kimi geriyə PSI-ə ötürür (bax Şəkil 12-44).

PSI Vaitəsilə Tsiklik Elektron Axını Proton-Hərəkətverici Qüvvəni Yaradır amma NADPH və ya O_2 Yaratmır

Artıq bizim gördüyümüz kimi, PSI-də xətti elektron axını zamanı elektronlar reduksiya olunmuş ferredoksindən $NADP^+$-a keçir, nəticədə NADPH istehsal olunur (bax Şəkil 12-44). Amma, bəzi vəziyyətlərdə, xüsusən bitkilər quraqlıq, yüksək işıq intensivliyi, karbon iki oksidin səviyyəsinin aşağı olması kimi bəzi stress hallarında hüceyrələrə xətti elektron nəqliyyatı zamanı istehsal etdiyi NADPH-la müqayisədə daha çox miqdarda ATP yaratmaq lazım gəlir. Bunu etmək üçün onlar fotosintetik yolla PSI-i müşayət edən heç bir NADPH istehsalı olunmadan ATP istehsal edirlər. Bu, *tsiklik fotofosforlaşma* və ya *tsiklik elektron axını* adanan (Şəkil 12-45), PSI-dən asılı olan və PSII-dən asılı olmayan proseslə həyata keçirilir. Bu prosesdə, elektronlar PSI, ferredoksin, plastoxinon (Q) və sitoxrom *bf* kompleksi arasında dövrə edir, normal halda PSI-də NADPH istehsal edən ferredoksin-$NADP^+$ reduktazadan yan keçir. Beləliklə, tsiklik elektron axını zamanı proton vurulması əlavə ATP sintezinə imkan verir, amma xalis NADPH istehsalı olunmur, ona görə də O_2 əmələ gətirmək üçün H_2O-yu oksidləşdirmək lazım olmur.

Ali bitkilərdə ATP:NADPH nisbətinə nəzarət edən iki fərqli tsiklik elektron axını yolu mövcuddur (bax Şəkil 12-45). Əsas yol PGR5-PGRL-1-dən asılı olan yoldur, bunu tezliklə təsvir edəcəyik, bu yol səmərəli fotosintezi və stresə qarşı mühafizəni təmin edir. Kiçik, ikinci dərəcəli yol *NADPH dehidrogenazaya-bənzər kompleksdən-asılı olan* yoldur, stresə cavab zamanı yaranır və H_2O_2 vasitəsilə tənzimlənmənin hədəfidir. NADPH dehidrogenazaya-bənzər kompleks çox böyük multizülal kompleksidir, formasına və tərkibinə görə mitoxondrial kompleks I ilə oxşardır (bax Şəkil 12-22), Q-ni QH_2-yə reduksiya edərkən NADPH və ya NADH-ı oksidləşdirir. Amma görünür, NADH-dehidrogenazaya bənzər komleksin NADH-ın oksidləşməsi üçün vacib olan subvahidi yoxdur.

Tsiklik elektron axını zamanı, işığın udulması ilə və PSI-də fotoelektrik daşınma ilə yaranan yüksək enerjili elektronlar PSI-in ferredoksinə bənzər subvahidindən ya PGR5-PGRL1 heterodimerə ya da NADH dehidrogenazaya-bənzər kompleksə ötürülür. Həqiqətən də, dəlillər göstərir ki, bu iki elektron akseptorunun hər biri LHC vasitəsilə yaranan superkomplekslərdə PSI ilə müstəqil assosasiya edir. Bu elektron akseptorlarının hər ikisi sonra Q-ni QH_2-ə reduksiya edir, daha sonra, əvvəlcədən izah etdiyimiz kimi, xətti elektron axını üçün protonlar və elektronları Q tsikli ilə sitoxrom *bf* kompleksinə ötürür (bax Şəkil 12-44). Protonlar sitoxrom *bf* kompleksi vasitəsi ilə və ola bilsin ki, NADH dehidrogenazaya-bənzər kompleks vasitəsi ilə tilakoid membranından keçərək lümenə daşınır. Nəhayət sonda, plastosianin elektronları sitoxrom *bf* kompleksindən PSI-ə qaytararaq tsikli tamamlayır. Tsiklik elektron axını purpur bakteriyaların tək fotosistemindəki tsiklik prosesə oxşardır (bax Şəkil 12-43). Tsiklik elektron axını ilə yaranan proton-hərəkətverici qüvvəsi F_0F_1 kompleksi (ATP sintaza) ilə ATP sintezini aparır və beləliklə ATP:NADPH nisbətini yüksəldir.

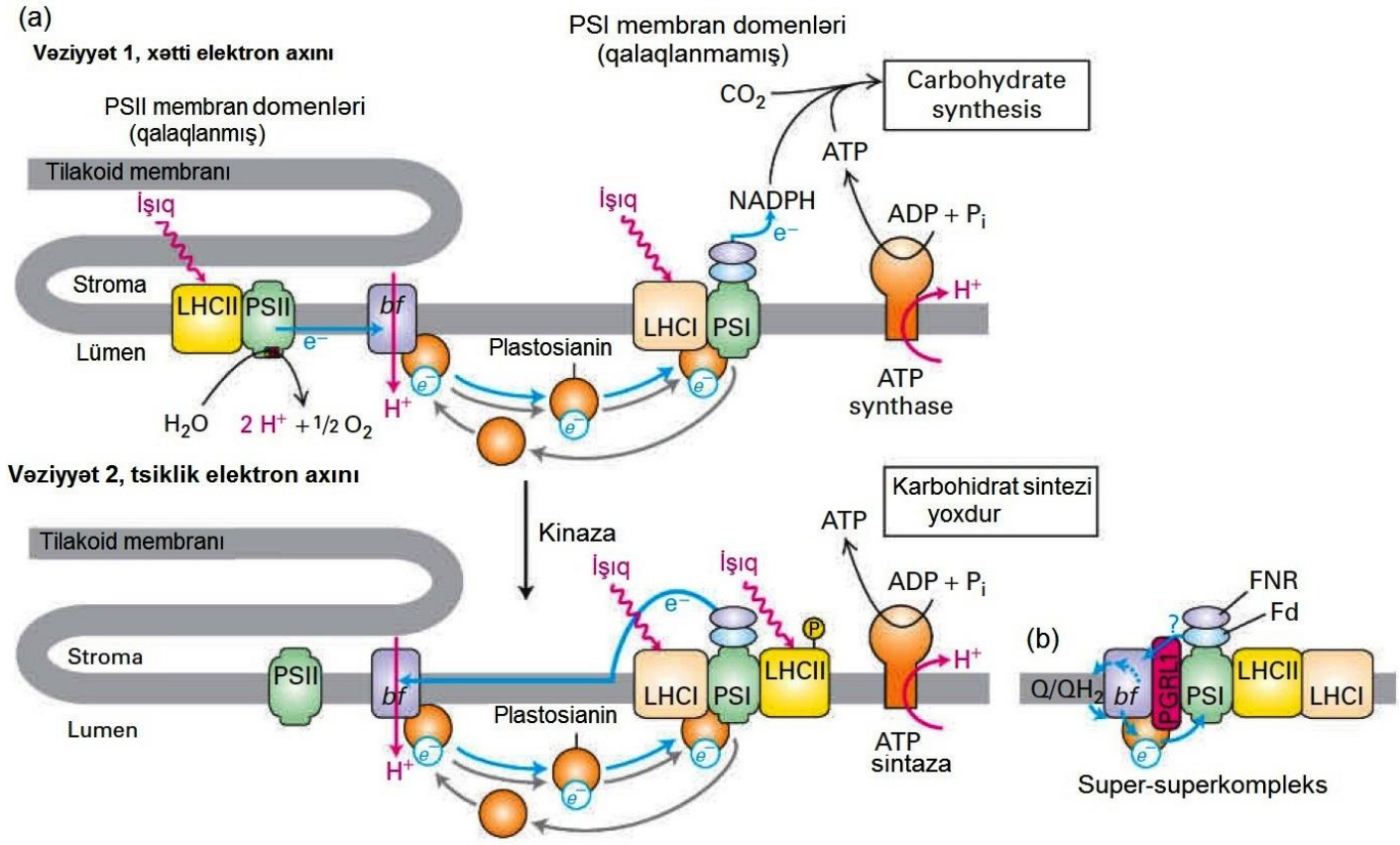
Fotosistem I və II-nin Nisbi FəallıqlarıTənzimlənir

Xloroplastlar ATP və NADPH istehsalının müvafiq balansını qoruyub saxlamaq üçün, ətraf mühit işığının dalğa uzunluğunun və intensivliyinin dəyişilməsinə (günün vaxtından, buludun olmasından və sair asılı olaraq dəyişilməsi) PSI və PSII-in nisbi məhsuldarlığını dəyişdirməklə cavab verirlər. Böyük üstünlüklə üst-üstə yığılmış qranalarda yerləşən PSII-in və üstünlüklə bir qatlı tilakoid membranlarda yerləşən PSI-in xətti elektron axını zamanı ardıcıllıqla fəaliyyət göstərməsi üçün iki reaksiya mərkəzinə çatdırılan enerjinin miqdarına elə nəzarət olunmalıdır ki, hər iki mərkəz eyni sayda elektronu fəallaşdıra bilsin. Tarazlaşdırılmış bu şərait hal-1 adlandırılır (Şəkil 12-46a). Əgər iki fotosistem bərabər səviyyədə həyacanlanmamışsa, o zaman tsiklik elektron axını PSI-də baş verir və PSII az fəal olur (hal-2).

PSI və PSII-nin nisbi fəaliyyətinin tənzimlənməsinin əsasında duran bir mexanizm tilakoid membranı zülallarının, o cümlədən PSII və LHCII-nin bir sıra proteinkinaza və proteinfosfatazalarla həyata keçirilən fosforlaşması və defosforlaşmasıdır. Fosforlaşmada, xüsusilə də LHCII-nin fosforlaşmasında dəyişilmələr antenna kompleksinin tilakoid membranı-daxili (qalaqlanmamış membrana qarşı qranalar) paylanmasını və beləliklə PSI və PSII-nin differensial qarşılıqlı təsirini dəyişə bilər. Xüsusi bir fotososteml nə qədər çox LHCII assosasiya edərsə bu sistem işıqla bir o qədər səmərəli fəallaşacaq və onun elektron nəqliyyatına da töhfəsi bir o qədər çox olacaq.

LHCII-nin fosforlaşmamış forması daha böyük üstünlüklə PSII ilə assosasiya edir, fosforlaşmış forması isə tilakoid membranında qranadan birqatlı rayona diffuziya edir və PSI ilə fosforlaşmamış formaya nisbətən daha çox assosasiya edir (birləşir). PSII-nin daha böyük üstünlüklə udduğu işıq şəraiti LHCII-kinazanın fəallaşması, LHCII fosforlaşmasının artması, PSI-in PSII-ə nisbətən kompensasiyaedici artan fəallaşması və beləliklə, hal 2-də tsiklik elektron axınının artması ilə nəticələnir (bax Şəkil 12-46a). *Chlamydomanas reinhardtii* yaşıl yosunu hal 2-ə məcbur olunduqda PSI, LHCI, LHCII, Cyt *bf*, ferredoksin-$NADP^+$-reduktaza (FNR) və tsiklik elektron axınında iştirak edən inteqral membran zülalı PGRL1-dən ibarət olan, amma PGR5-in daxil olmadığı "super-superkompleksi" ayırmaq mümkün olmuşdur (Şəkil 12-46b). Beləliklə, elektron nəqliyyat zəncirlərinin səmərəli fəaliyyəti, fərdi zülallardan komplekslərə, superkomplekslərə, super-super komplekslərə qədər artan ölçüdə və mürəkkəblikdə olan funksional komplekslərin təkamülüni özündə cəmləyir.

Bitkilərdə fotosistemlərin supermolekulyar təşkilinin nizamlanması, düşən işıq şəraitlərndən və bitkilərin metabolik tələbatından asılı olaraq onları ATP istehsalına doğru (vəziyyət 2) və ya reduksiya olunan ekvivalentlərin (NADPH) və ATP-nin yaranmasına (vəziyyət 1) doğru yönəldə bilmək təsirinə malikdir. Həm NADPH həm də ATP CO_2-nin şəkərə və nişastaya çevrilməsi ─ fotosintezin dördüncü mərhələsi üçün tələb olunur, bunu biz bu fəsilin sonuncu bölməsində əhatə edirik.



ŞƏKİL 12-46 LHCII-nin fotofosforlaşması və tsiklik elektron axınına qarşı xətti elektron axınının tənzimlənməsi. (a) (*Yuxarıda*) Normal günəş işığında, PSI və PSII bərabər fəallaşırlar və fotosistemlər hal-1-də təşkil olunurlar. Bu düzülüşdə, işıq-toplayan kompleks II (LHCII) fosforlaşmır və LHCII trimerin altı nüsxəsi bir sıra digər işıq toplayan zülallarla birlikdə, qranada sıx şəkildə assosasiya edən superkompleks daxilində dimer PSII reaksiya mərkəzini əhatə edirlər (aydın olmaq üçün superkomplekslərin molekulyar detalları göstərilmir). Nəticədə, PSII və PSI xətti elektron axınında paralel fəaliyyət göstərə bilirlər. (*Aşağıda*) İki fotosistemin işıqla həyacanlanması qeyri-tarazlıqda olanda (məsələn, PSII vasitəsi ilə həddən artıq işıq udulanda), LHCII fosforlaşmış olur, PSII-dən dissosasiya edir və bir qatlı (unstacked) membranlara diffuziya edir, orada PSI ilə və onunla daimi birləşmiş LHCI ilə assosasiya edir. Bu alternativ supermolekulyar təşkilolunmada (hal-2) udulan işıq enerjisinin əksər hssəsi PSI-ə keçirilir, tsiklik elektron axını və ATP sintezi təmin olunur, amma NADPH istehsal olunmur və uyğun olaraq CO_2 fiksasiyası baş vermir. (b) PSI "super-suprkompleksin" modeli PGRL1-dən-asılı olan tsiklik elektron axını ilə birlikdə mərhələ 2-də yaşıl yosunlardan ayrılmışdır. Super-suprkompleks inteqral membran zülalı PGRL1 də daxil olmaqla çoxsaylı komplekslərə malikdir (amma PGR5 bura daxil deyil). Bax F.A.Wollman,2001, *EMBO J.* **20**:3263 və M. Iwai et al., 2010, *Nature* **464**:1210-1213.

12.7 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSİYALARI

Fotosistemlərin Molekulyar Analizi

- Bənövşəyi bakteriyaların tək fotosisteminin reaksiya mərkəzində işıqla-həyacanlanan xüsusi-cüt xlorofil *a* molekullarından tsiklik elektron axını, əsasən plazma membranında F_0F_1 kompleksla ATP sintezinin aparılmasında istifadə olunan proton-hərəkətverici qüvvəni yaradır (bax Şəkil 12-43).
- Bitkilər, müxtəlif funksiyalara malik olan və tilakoid membranında fiziki olaraq ayrı yerləşən iki fotosistemə, PSI və PSII-yə malikdirlər. PSII H_2O-yu O_2-ə çevirir, PSI isə $NADP^+$-i NADPH-a reduksiya edir. Sianobakteriyalar iki anoloji fotosistemə malikdirlər.
- Xloroplastlarda, işıq-toplayan komplekslər (LHC) tərəfindən udulan işıq enerjisi reaksiya mərkəzlərində xlorofil *a* mioekullarına (PSII-də P_{680} və PSI-də P_{700}) ötürülür.
- Elektronlar PSII-dən bakteriyal fotosistemlərdə mövcud olan daşıyıcılarla eyni olan daşıyıcılar vasitəsi ilə axır. Bakterial sistemlərdən fərqli olaraq, PSII-də fotokimyəvi oksidləşmiş P_{680}^+ H_2O-dan O_2-nin əmələ gəlməsi zamanı ayrılan elektronlar vasitəsi ilə P_{680}-a regenerasiya olunur (bax Şəkil 12-44, *solda*).
- Xətti elektron axınında, PSI-də fotokimyəvi oksidləşmiş P_{700}^+, PSII-dən sitoxron *bf* kompleksi və həllolan plastosianin vasitəsi ilə daşınan elektronlarla reduksiya olunaraq P_{700} əmələ gətirir. PSI-in sonrakı həyacanlanması zamanı P_{700} dən buraxılmış elektronlar bir sıra daşıyıcılar vasitsi ilə sonda $NADP^+$-a daşınaraq NADPH yaradır (bax Şəkil 12-44, *sağda*).

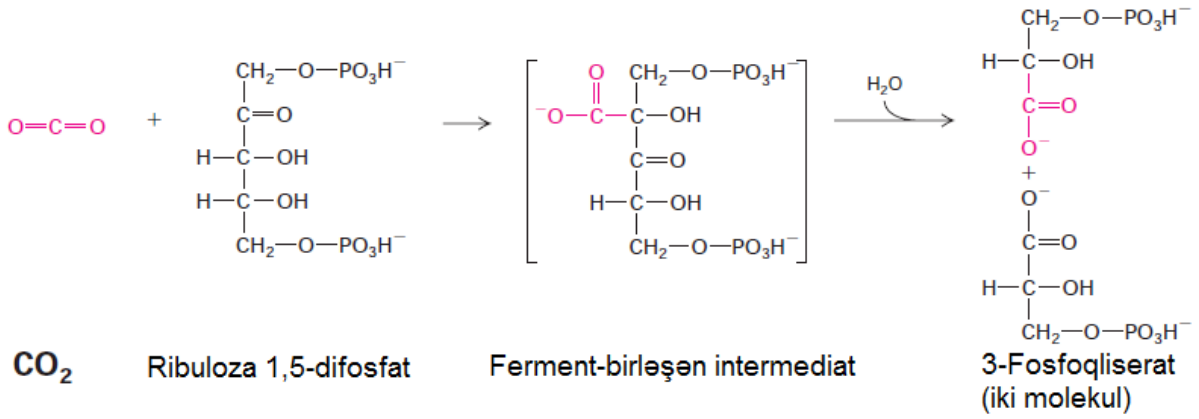
- Xloroplastlarda işığın piqmentlər tərəfinfən udulması reaktiv oksigen nümunələrini (ROS), o cümlədən sinqlet oksigeni, $^1O_2$ və hidrogen peroksidi, H_2O_2 yarada bilir. Onlar çox kiçik miqdarda toksik deyillər və hüceyrə metabolizmini tənzimləmək üçün hüceyrədaxili siqnal molekulları kimi istifadə olunurlar. Onlar böyük miqdarda olduqda toksikdirlər. Karotinoidlər və antioksidant fermentlər kimi kiçik molekullu scavenger-lər ROS-la induksiya olunan zədələnməyə qarşı mühafizəyə kömək edirlər, amma, sinqlet oksigenin PSII-də D1 zülalı zədələməsi hələ də baş verir və fotoingibirləşməyə səbəb olur. HSP70 çaperon zədələnmədən bərpa olunmaqda PSII-yə kömək edir.
- PSI və PSII-nin hər ikisinin tələb olunduğu xətti elektron axınının əksinə olaraq tsiklik elektron axınında yalnız PSI iştirak edir. Baxmayaraq ki, bu yolda proton-hərəkətverici qüvvə yaranır, nə NADPH nə də O_2 əmələ gəlmir.
- İşıq-toplayan kompleks II-nın (LHCII) geriyə dönən fosforlaşması və defosforlaşması tilakoid membranlarında fotosintetik aparatın funksional təşkilinə nəzarət edir. Vəziyyət 1-də xətti elektron axınına üstünük verdiyi halda, vəziyyət 2-də tsiklik elektron axınına üstünlük verir (bax Şəkil 12-46). Çox böyük superkomplekslər tsiklik elektron axınına daxil ola bilirlər.

12.8 Fotosintez Zamanı CO_2 Metabolizmi

Xloroplastlar yaşıl yarpaqlarda çoxsaylı metabolik reaksiyaları həyata keçirirlər. CO_2 fiksasiyasından — qaz şəkilli CO_2-nin kiçik üzvi molekullara və sonra da şəkərlərə daxil olmasından əlavə, demək olar ki, bütün amin turşularının, yağ turşulartının və karotinlərin, bütün pirimidinlərin və demək olar ki, əksər purinlərin sintezi xloroplastlarda baş verir. Amma, şəkərlərin CO_2-dən sintezi bitki hüceyrələrində ən çox öyrənilmiş biosintez yoludur. Biz, əvvəlcə unikal yola, **Kalvin tsikli** (onu kəşf edən Melvin Kalvinin şərəfinə) kimi məlum olan, CO_2-nı üç-karbonlu komponentlərə qədər fiksasiya edən, ATP hidrolizindən və NADPH oksidləşməsindən ayrılan enerji ilə təmin olunan yola baxacağıq.

Rubisco Xloroplast Stromasında CO_2-ni Fiksasiya Edir

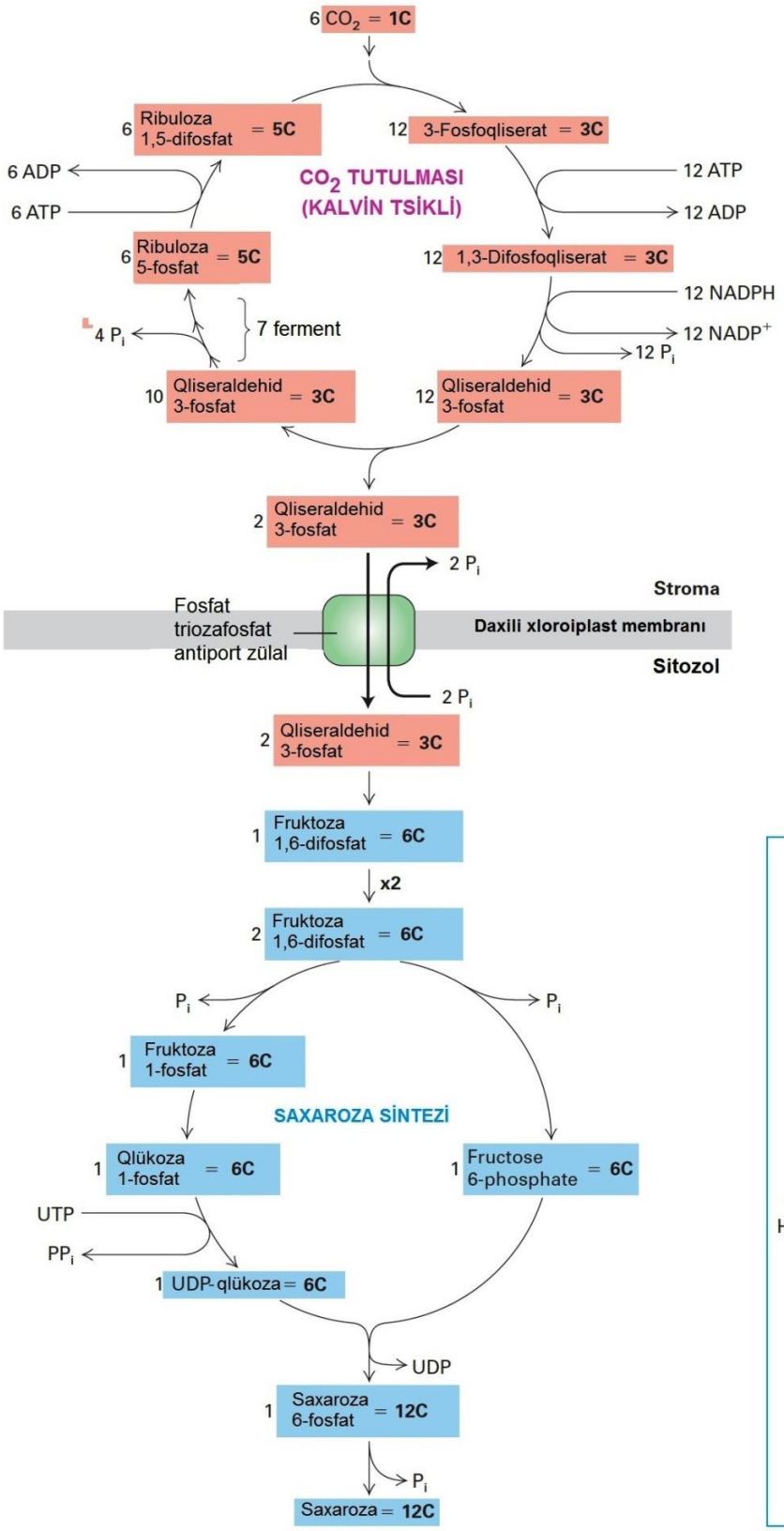
Ribuloza 1,5-difosfat karboksilaza, və ya **rubisco**, CO_2-ni səlәf molekullarına fiksasiya edir, onlar da sonra karbohidratlara çevrilirlər. Rubisco xloroplastların stroma boşluğunda yerləşir. Bu ferment CO_2-ni beş-karbonlu şəkərə Ribuloza 1,5-difosfata əlavə edib iki molekul üç-karbona-malik olan 3-fosfoqliseratı əmələ gətirir (Şəkil 12-47). Rubisco çox böyük fermentdir (~500 kDa), çox rast gəlinən formaları səkkiz eyni böyük subvahiddən və səkkiz eyni kiçik subvahiddən təşkil olunmuşdur. Bir subvahid xloroplast DNT-sində, digəri isə nüvə DNT-sində kodlaşdırılır. Rubisco-nun katalitik sürəti kifayət qədər aşağı olduğundan, kifayət qədər CO_2 fiksasiyası üçün fermentin çox saylı nüsxələri lazım olur. Həqiqətən də, bu ferment xloroplastın həll olan zülallarının 50 faizə qədərini təşkil edir və guman olunur ki, yer üzündə ən bol zülaldır. Belə təxmin edilir ki, rubisco hər il atmosferdən 10^{11} ton CO_2-ni fiksasiya edir.

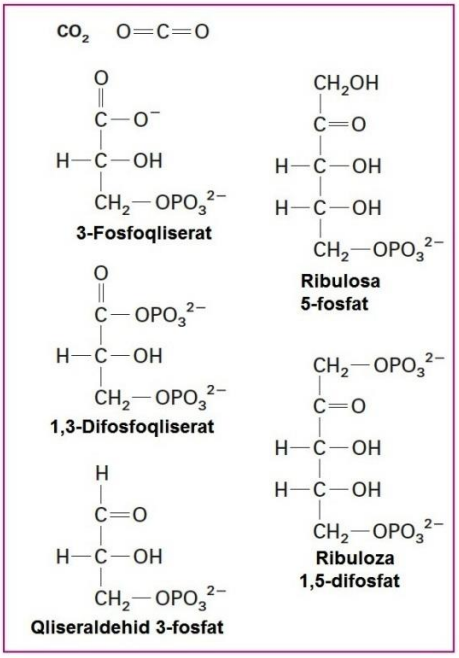


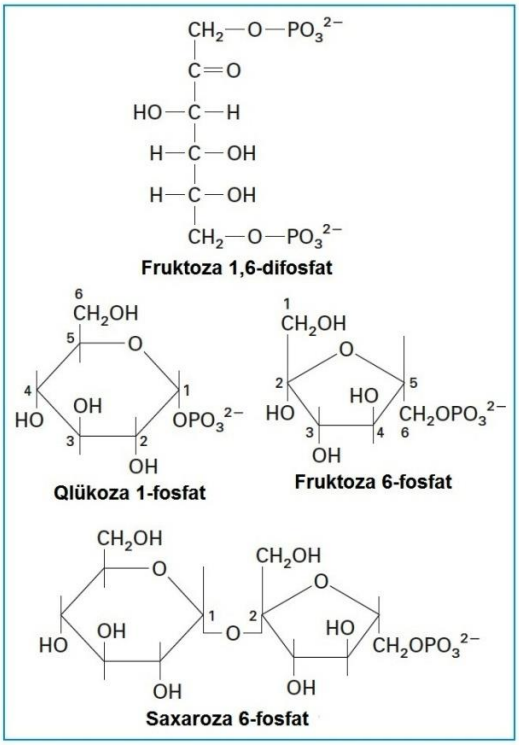
ŞƏKİL 12-47 Rubisconun CO_2-nı üzvi componentlərə fiksasiya edən ilkin reaksiyası. Ribuliza 1,5-difosfat karboksilaza (rubisco) ilə kataliz olunan bu reaksiyada, CO_2 beş-karbonlu şəkər ribuloza 1,5-difosfatla birləşir. Reaksiya məhsulu iki molekul 3-fosfoqliseratdır.

Fotosintezedici yosun qısa pulslarla ^{14}C-nişanlanmış CO_2-na məruz qoyuduqdan dərhal sonra, hüceyrələr dağıdıldı, sürətlə nişanlananlar 3-fosfoqliseratlar olmuşdur və bütün radioaktivlik karboksil qruplarında tapılmışdır. İlkin olaraq CO_2 üç-karbonlu birləşməyə daxil olduğundan, Kalvin tsikli də karbon fiksasiyasının *C_3 yolu* adlandırıldı (Şəkil 12-48).

Rubisco ilə əmələ gələn 3-fosfoqliseratın taleyi mürəkkəbdir: bəziləri heksozalara çevrilərək nişastaya və ya saxarozaya daxil olurlar, digərləri isə ribuloza 1,5-difosfatı regenerasiya etmək üçün istifadə olunur. 3-fosfoqliseratdan ribuloza 1,5-difosfatı regenerasiya etmək üçün ən azı doqquz müxtəlif fermentin iştirakı tələb oılunur. Kəmiyyətcə, rubisco tərəfindən yaranan hər 12 molekul 3-fosfoqliseratdan (cəmisi 36 C atomu) iki molekul (6 atom) qliseraldehid 3-fosfata (və sonralar bir heksozaya) çevrildiyi halda, qalan 10 molekul (30 C atomu) 6 molekul ribuloza 1,5-difosfata çevrilir (Şəkil 12-48, *yuxarıda*). 6 CO_2 molekulunun fiksasiyası və 2 qliseraldehid 3-fosfat molekullarının əmələ gəlməsi fotosintezin işıq tələb edən prosesi ilə yaranmış 18 ATP-nin və 12 NADPH-ın sərf olunmasını tələb edir.







ŞƏKİL 12-48 Fotosintez zamanı karbon yolu. (*Yuxarıda*) Altı molekul CO_2 iki molekul qliseraldehid 3-fosfata çevrilir. Kalvin tsiklini təşkil edən bu reaksiyalar, xloroplast stromasında baş verir. Fosfat/triozafosfat antiporter vasitəsi ilə qliseraldehid 3-fosfatın bir hissəsi fosfatla mübadilədə sitozola daşınır. (*Aşağıda*) Sitozolda, eqzogen reaksiyalar sırası qliseraldehid 3-fosfatı fruktoza 1,6-difosfata çevirir. İki molekul fruktoza 1,6-difosfat disaxarid şəkərlərin birinin sintezində istifadə olunur. Qliseraldehid 3-fosfatın bir hissəsi (burada göstərilmir), bitkilərin inkişafı üçün əhəmiyyətli olan komponentlərə, amin turşularına və yağlara çevrilir.

Fiksasiya Olunmuş CO_2-dən İstifadə Edərək Saxarozanın Sintezi Sitozolda Tamamlanır

Xloroplast stromasında formalaşdıqdan sonra, qliseraldehid 3-fosfat fosfat mübadiləsi yolu ilə sitozola daşınır. Saxaroza sintezinin son mərhələləri (Şəkil 12-48, *aşağıda*) yarpaq hüceyrələrinin sitozolunda baş verir.

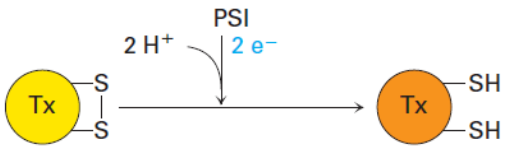
Hüceyrə güclü şəkildə saxaroza eksport edərkən, daxili xloroplast membranında fosfat/qliseraldehid 3-fosfat antiporter fiksasiya olunmuş CO_2-ni (qliseraldehid 3-fosfat kimi) sitozola gətirir. Fiksasiya olunmuş CO_2 xloroplastı o vaxta qədər tərk edə bilmir ki, qliseraldehid 3-fosfat kimi stromadan kənara daşınan fosfatı əvəz etmək üçün oraya fosfat daxil olsun. Saxarozanın sintezi zamanı qliseraldehid 3-fosfatdan qeyri-üzvi fosfat qrupları buraxılır (Şəkil 12-48, *aşağıda solda*). Beləliklə saxarozanın sintezi, antiporter üçün fosfatı təmin etməklə xloroplastdan əlavə qliseraldehid 3-fosfatın sitozola daşınmasına imkan yaradır. Bunu qeyd etmək lazımdır ki, qliseraldehid 3-fosfat qlikolitik aralıq məhsuldur və qliseraldehid 3-fosfatın heksozalara çevrilməsi demək olar ki, qlikolizin əksi olan prosesdir.

Nişastanın sintezi daha mürəkkəbdir. Böyük nişasta polimerini yaratmaq üçün istifadə olunan əsas substrat ADP-qlükozadır. Bu polimerləşmə stromada baş verir və nişasta polimerləri ehtiyat kimi qranullar adlanan sıx bükülmüş kristal aqreqatlar şəklində orada saxlanılır. Qlükosza 1-fosfatdan və ATP-dən ADP-qlükozanı əmələ gətirən ferment həm stromada həm də sitozolda tapılmışdır, bu göstərir ki, sitozolda olan müxtəlif quruluşlu heksozalar nişasta sintezi üçün stromaya import olunurlar.

İşıq və Rubisco-Aktivaza CO_2 Fiksasiyasını Stimullaşdırır

CO_2 fiksasiyasını kataliz edən Kalvin tsikli fermentləri qaranlıqda kəskin şəkildə fəalsızlaşırlar, bununla da qaranlıqda yaranan (məsələn, nişastanın parçalanması ilə) ATP-ni başqa sintetik reaksiyalar üçün, məsələn lipidlərin və amin turşularının biosintezi üçün qoruyub saxlayırlar. Bu nəzarətə kömək edən bir mexanizm Kalvin tsikli fermentlərinin pH-dan asılılığıdır. Protonlar fotoelektron nəqliyyatı zamanı stromadan tilakoid lümeni daxilinə daşındığına görə (bax Şəkil 12-44), stromanın pH-ı qaranlıqda ~7-dən işıqda ~8-ə qalxır. Bir sıra Kalvin tsikli fermentlərinin fəallığının yuxarı pH-da artması işıqda CO_2 fiksasiyasını gücləndirir.

Tioredoksin (*Tx*) adlanan stroma zülalı da bəzi Kalvin tsikli fermentlərinin nəzarət olunmasında rol oynayır. Tioredoksin qaranlıqda disulfid əlaqələrinə malik olur, işıqda elektronlar ferredoksin vasitəsi ilə PSI-dən tioredoksinə daşınaraq onun disulfid əlaqələrini reduksiya edir:

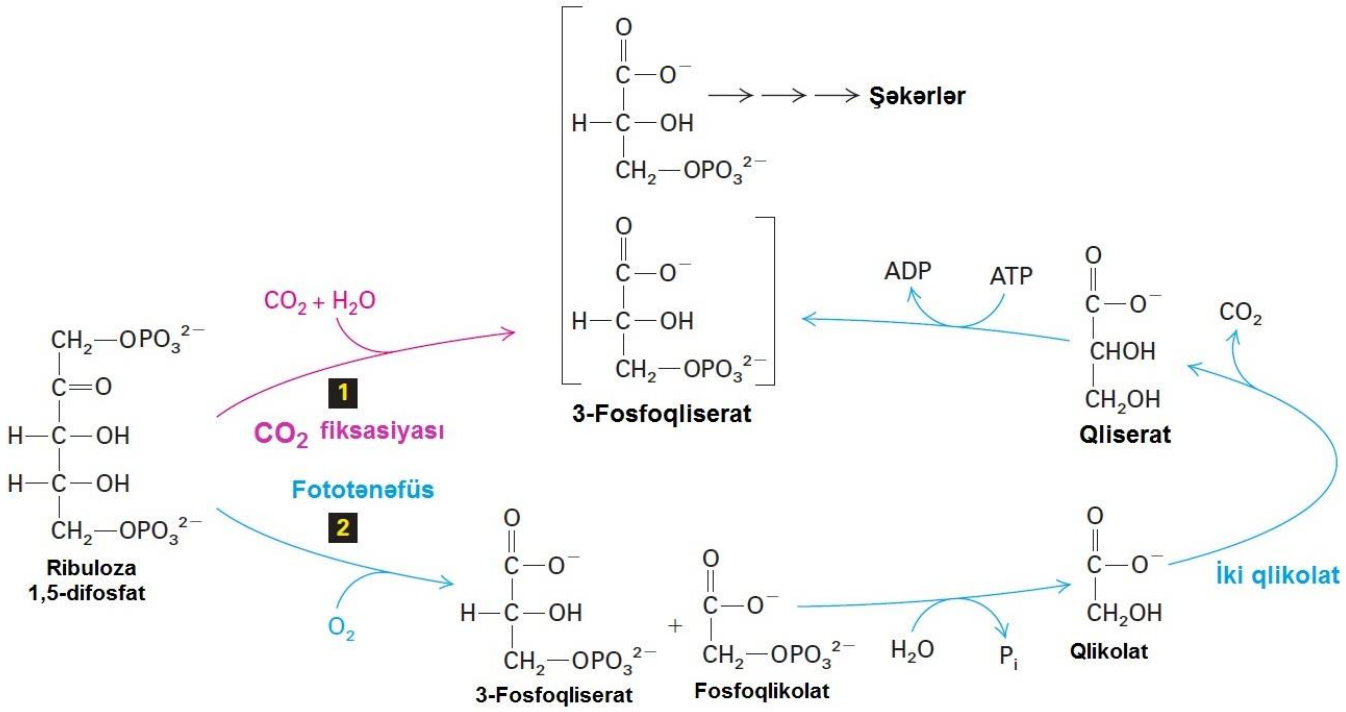


Reduksiya olunmuş tioredoksin sonra bir sıra Kalvin tsikli fermentlərində disulfid əlaqələrini reduksiya etməklə onları fəallaşdırır. Qaranlıqda, tioredoksin yenidən oksidləşmiş hala keçdikdə, bu fermentlər yenidən oksidləşirlər və bu yolla fəalsızlaşırlar. Beləliklə, bu fermentlər stromanın redoks vəziyyətinə həssasdırlar və öz növbəsində onlar işığa da həssasdırlar — yəni, fermentativ fəallığı işıqla tənzimləyən çox zərif mexanizm mövcuddur.

Rubisco da belə işıq/redoks-həssas fermentlərdən biridir, hərçənd ki, onun tənzimlənməsi çox mürəkkəbdir və hələ də tam anlaşılmır. Yüksək CO_2 və Mg^{2+} qatılıqları mövcud olanda, rubisco spontan şəkildə fəallaşır. Fəallaşma reaksiyası CO_2-nin fermentin fəal mərkəzindəki lizinin yan zəncirində amin qrupuna kovalent əlavə olunmasına gətirib çıxarır və karbamat qrupu yaranır, buna isə sonra fermentativ fəallıq üçün tələb olunan Mg^{2+} ionları birləşir. Amma, normal şərait daxilində, CO_2-ın ətraf mühit səviyyəsindəki qatılığında reaksiya zəif olur və adətən ATP-azaların AAA^+ ailəsinin üzvü olan *rubisco aktivaza* tərəfindən kataliz olunmasını tələb edir. Rubisco aktivaza ATP-ni hidroliz edir və ayrılan enerjini rubisco-nun fəal mərkəzini təmizləmək üçün istifadə edir ki, CO_2 onun fəal mərkəzinin lizin qalığına əlavə oluna bilsin. Rubisco aktivaza həmçinin rubisco-da fəallaşdırıcı konformasiya dəyişikliyini (qeyri fəal-bağlı vəziyyətdən fəal açıq vəziyyətə) sürətləndirir. Rubisco aktivazanın tioredoksinlə tənzimlənməsi, qismən də olsa bəzi növlərdə rubisco-nun işıq/oksidləşmə-redkksya həssaslığına cavadehdir. Bundan başqa, rubisco aktivazanın fəallığı ATP:ADP nisbətinə də həssasdır. Əgər bu nisbət aşağıdırsa (nisbətən yüksək ADP-dirsə), onda aktivaza rubisco-nu fəallaşdırmayacaq (və hüceyrə öz kasadlaşmış ATP-sindən CO_2 fiksasiyası üçün az sərf edəcək). Fotosintez müxtəlif tipik bitki stresslərinə - orta (mülayim) istilik, soyuq temperatura, quraqlığa (su məhdudiyyatı), yüksək duzluluğa, yüksək işıq intensivliyinə və UV radiasiyasına həssasdır. Ən azı bunlardan bir neçəsi rubisco aktivazanın fəallığını reduksiya etməklə və beləliklə də rubiskonu inaktivasiya etməklə CO_2 fiksasiyasına təsir edirlər. CO_2 fiksasiyasının ingibirləşməsi NADPH sərf olunmasını reduksiya edir. Güclü işıq şəraitində NADPH/$NADP^+$ nisbətinin yüksəkliyi $NADP^+$-a elektron nəqliyyatını reduksiya edir və O_2-ə axmasını artırır, nəticədə ROS əmələ gəlməsi yüksəlir, bu isə hüceyrə siqnalizasiyasına və müxtəlif hüceyrə proseslərinə maneçilik törədir. Enerji istifadəsində və karbon udulmasında rubisconun əsas rolunu nəzərə alsaq təccübli deyildir ki, onun fəallığı həm fərdi xloroplast həm də müəyyən mənada, bütün biosferada möhkəm şəkildə tənzimlənir.

Fototənəffüs Karbon Fiksasiyası ilə Rəqabətdədir C_4 Bitkilərdə Reduksiya Olunmuşdur

Yuxarıda qeyd olunduğu kimi, rubisco fotosintezin bir hissəsi kimi CO_2-nin ribuloza 1,5-difosfata birləşməsini kataliz edir. O eyni substratla – ribuloza 1,5-difosfatla ikinci fərqli, *rəqabətdə olan* reaksiyanı da – ikinci substrat kimi CO_2 əvəzinə O_2 ilə fototənəffüs kimi məlum olan prosesi də kataliz edir (Şəkil 12-49). İkinci reaksiyanın məhsulları bir molekul 3-fosfoqliserat və bir molekul iki-karbonlu birləşmə fosfoqlikolatdır. Ətraf mühitdə CO_2 qatılığı nisbətən yuxarı olduqda karbon-fiksasiya edən reaksiya daha üstünlüklə gedir, amma fototənəffüs CO_2 səviyyəsi aşağı və O_2 yuxarı olduqda üstünlük təşkil edir. Fototənəffüs işıqda baş verir, O_2 istifadə edib ribuloza 1,5-difosfatı hissə-hissə CO_2-a çevirir. Şəkil 12-49-da göstərdiyi kimi, fototənəffüs bitkinin enerji ehtiyatının israfçısıdır: o ATP və O_2 sərf edərək

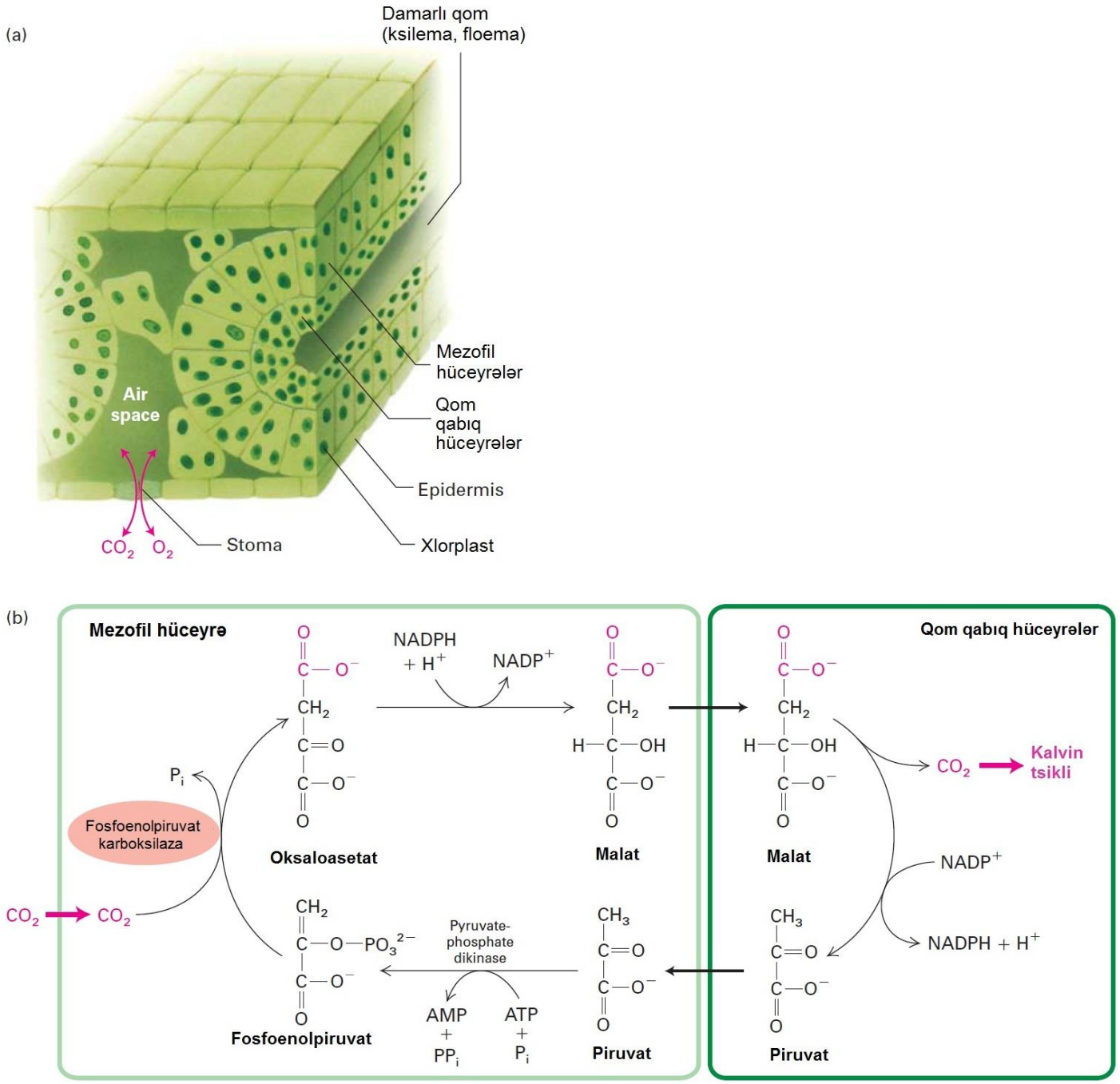


ŞƏKİL 12-49 CO_2 fiksasiyası və fototənəffüs . Rəqabətdə olan bu yolların hər ikisi ribuloza 1,5-difosfat karboksilaza (rubisco) ilə inisiasiya olunur və hər ikisi substrat kimi ribuloza 1,5-difosfatı sərf edir. CO_2 fiksasiyası, (1-ci yol), CO_2-ın yüksək qatılığında və O_2-nin aşağı qatılığındaə üstünlük təşkil edir; fototənəffüs, (2-ci yol) CO_2 qazının aşağı qatılığında və O_2-nin yüksək qatılığında (bunlar normal atmosfer şəraitləridir) baş verir. Fototənəffüslə yaranan fosfoqlikolat, peroksisomlarda və mitoxondrilərdə, eləcə də xloroplastlarda baş verən kompleks reaksiyalar dəsti vasitəsi ilə yenidən istifadəyə qoşulur. Xalis nəticə olaraq, fototənəffüs zamanı yaranan hər iki fosfoqlikolat molekulundan (dörd C atomu) bir molekul 3-fosfoqliserat əmələ gəlir və yenidən istifadəyə qoşulur və bir molekul CO_2 itirilir.

kənara buraxılan CO_2 istehsal edir. Həqiqatən də, CO_2-nin səviyyəsi aşağı və O_2-nin səviyyəsi yuxarı olduqda, Kalvin tsikli ilə fiksasiya olunmuş CO_2-nin çox hissəsi fototənəffüs nəticəsində itirilir. Rubisko ilə kataliz olunan bu, təccübləndirici, israfçı alternativ reaksiya ola bilsin ki, fermentin spesifik olaraq nisbətən mənasız CO_2 molekuluna birləşməsi və həm CO_2-nın həm də O_2-nin eyni başlanğıc ferment/ribuloza 1,5-difosfat aralıq məhsulla reaksiya girmək və fərqli məhsulları əmələ gətirmək qabliyyəti fermentin qaçılmaz çətinliyinin nəticəsidir.

Hədən artıq miqdarda fototənəffüs, quru və isti ətraf mühit şəraitində bitkilər üçün problemə çevrilə bilər, çünki onlar həddən artıq rütubətin itirilməməsi üçün öz yarpaqlarında qaz mübadiləsi məsamələrini (ağızcıqları) uzun müddət bağlı saxlamalıdırlar. Bunun nəticəsində, hüceyrə daxilində CO_2 səviyyəsi rubisconun CO_2-ə olan K_m-dən aşağı düşə bilər. Bu şərait altında, fotosintezin gedişi zəifləyir, fototənəffüs güclü şəkildə üstünlük təşkil edir və bitki qənaətbəxş (adekvat) olmayan miqdarda CO_2 fiksasiya etmək təhlükəsi ilə üzləşə bilir. Qarğıdalı, şəkər qamışı, yabanı darı və istidə və quru mühitdə bitən başqa bitkilər, CO_2-nin iki-pilləli fiksasiyasından istifadə etməklə bu problemdən yayınmaq yolunu yaradıb inkişaf etdirmişlər, bu zaman CO_2-nin toplanması pilləsi Kalvin tsikli ilə davam edir. Bu yol ona görə *C4 yol* adlandırılmışdır ki, [^{14}C]CO_2 nişanlanması göstərdi ki, fotosintezin gedişində bu yolda əmələ gələn ilk radioaktiv molekullar, Kalvin tsiklini (C_3 yol) inisiasiya edən üç-karbonlu molekullar deyil oksalasetat və malat kimi dörd-karbonlu birləşmələrdir.

C_4 yoluna iki tip hüceyrələr daxildir: *mezofil hüceyrələr*, yarpağın daxili hissəsində hava boşluqlarına daha yaxın yerləşirlər, və *örtük-ötürücü* (*bundle sheath*) *hüceyrələr*, vazikulyar toxumanı əhatə edir və mezofil hüceyrələrin məruz qaldığı yüksək oksigen qatılığından uzaqlaşdırılmışlar (Şəkil 12-50a). C_4 bitkilərin mezofil hüceyrələrində, piruvatdan törənən üç-karbonlu molekul fosfoenolpiruvat CO_2 ilə reaksiyay girərək, dörd-karbonlu birləşmə oksalasetatı əmələ gətirir (Şəkil 12-50b). Bu reaksiyanı kataliz edən ferment, fosfoenolpiruvat karboksilaza, demək olar ki, yalnız C_4 bitkilərdə tapılmışdır və rubisco-dan fərqli olaraq O_2-ə həssas deyildir. Piruvatdan oksalasetata qədər olan ümumi reaksiyada bir ATP hidroliz olunur və mənfi ΔG malikdir. Ona görə də, CO_2 fiksasiyası hətta CO_2-ın aşağı qatılığında da davam edir. Mezofil hüceyrələrində əmələ gələn oksalasetat malata reduksiya olunur, o isə sonra xüsusi daşıyıcılarla örtük-ötürücü hüceyrələrinə keçirilir və orada dekarboksilləşmə yolu ilə CO_2 buraxılaraq Kalvin tsiklinə daxil olur (Şəkil 12-50b).



ŞƏKİL 12-50 C_4 bitkilərdə yarpağın anatomiyası və C_4 yolu. (a) C_4 bitkilərdə örtük ötürücü hüceyrələr ksilema və floemaya malik olan vazikulyar bükümü örtür. Ağızcıqların altındakı hava boşluğuna sıx yerləşən mezofil hüceyrələr mühitin aşağı CO_2 qatılığında CO_2-ni dörd-karbonlu molekullara assimilaysiya edə bilirlər və onları daxili örtük ötürücü hüceyrələrinə daşıyırlar. Örtük ötürücü hüceyrələri bol xloroplasta malik olurlar və fotosintezin və saxaroza sintezinin mərkəzdirlər. Saxaroza floema vasitəsi ilə bitkinin qalan bütün yerlərinə daşınır. Örtük ötürücü hüceyrələrə malik olmayan C_3 bitkilərdə, Kalvin tsikli CO_2-ni fiksasiya etmək üçün mezofil hüceyrələrdə fəaliyyət göstərir. (b) C_4 yolunda əsas ferment, mezofil hüceyrələrində CO_2-ni assimilyasiya edərək oksalasetatı əmələ gətirən fosfoenolpiruvat karboksilazadır. Malatın və ya başqa C_4 aralıq məhsulların örtük ötürücü hüceyrələrində dekarboksilləşməsi CO_2-ni ayırır, o isə standart Kalvin tsiklinə daxil olur (bax Şəkil 12-48, *yuxarıda*).

CO_2-ın mezofil hüceyrələrdən daşınmasına görə C_4 bitkilərin örtük ötürücü hüceyrələrində CO_2 qatılığı normal atmosferdəkindən çox yuxarı olur. Örtük ötürücü hüceyrələri həm də ona görə qeyri-adi olurlar ki, onlarda PSII olmur və onlar yalnız PSI ilə kataliz olunan tsiklik elektron axınına malik olurlar, ona görə də O_2 əmələ gəlmir. Örtük ötürücü hüceyrələrində CO_2 yüksək və O_2 aşağı qatılıqda olduqda rubisco vasitəsi ilə 3-fosfoqliseratı əmələ gətirmək üçün CO_2 fiksasiyası üstünlük təşkil edir və ribuloza 1,5-fosfatın fototənəffüsdə istifadə olunması ingibirləşir.

Əksinə, atmosferdə O_2-nin yüksək qatılığında C_3 bitkilərin mezofil hüceyrələrində fototənəffüs üstünlük təşkil edir (Şəkil 12-49, 2-ci yol), nəticədə C_3 bitkilərdə, rubisco ilə fiksasiya olunan CO_2-nin 50 faizə qədər böyük bir hissəsi yenidən CO_2-ə qədər oksidləşir. Mövcud olan CO_2-nin istifadə olunmasına görə C_4 bitkilər C_3 bitkilərə nisbətən daha böyük üstünlüyə malikdirlər, çünki C_4 ferment fosfoenolpiruvat karboksilaza Kalvin tsiklindəki rubisco-ya nisbətən CO_2-a daha yüksək afinliyə malikdir. Amma, tsiklik C_4 prosesində bir ATP bir AMP-yə çevrilir (piruvatdan fosfoenolpiruvatı yaratmaq üçün), beləliklə, NADPH və ATP-dən şəkərlərin fotosintetik istehsalının ümumi səmərəliliyi, CO_2 fiksasiyası üçün yalnız Kalvin tsiklindən istifadə edən C_3 bitkilərdə olduğundan aşağıdır. Bununla belə, qarğıdalı, və ya şəkər qamışı kimi C_4 ot bitkiləri üçün fotosintezin xalis sürəti, fototənəffüsdə itirilmənin aradan qaldırılması sayəsində buğda, düyü, və yulaf kimi C3 bitkilərə nisbətən iki və ya üç dəfə yüksəkdir.

Fotosintezin iki karbohidrat məhsulundan nişasta C_3 bitkilərin mezofil hüceyrələrində və C_4 bitkilərin örtük-ötürücü hüceyrələrində qalır. Bu hüceyrələrdə, nişasta qlikolizə məruz qalır, əsasən də qaranlıqda ATP, NADH və amin turşularının, lipidlərin və hüceyrənin başqa komponentlərinin quruluş bloklarında istifadə olunan digər kiçik molekulları əmələ gətirir. Əksinə, saxaroza fotosintetik hüceyrələrdən eksport olunaraq bütün bitki boyu orqanlara daşınır.

12.8 BÖLMƏNIN ƏSAS KONSEPSİYALARı

Fotosintez Zamanı CO_2 Metabolizmi

- Kalvin tsiklində, CO_2 xloroplast stromasında baş verən reaksiyalar sırası vasitəsi ilə üzvi molekullara fiksasiya olunur. Rubisco ilə kataliz olunan ilkin reaksiya üç-karbonlu aralıq məhsulu, 3-fosfoqliseratı əmələ gətirir. Tsikl zamanı əmələ gələn qliseraldehid 3-fosfatın bir hissəsi sitozola daşınır və saxarozaya çevrilir (bax Şəkil 12-48).
- Bir neçə Kalvin tsikli fermentinin işıqdan-asılı olan fəallaşması və başqa mexanizmləri işıqda CO_2 fiksasiyasını artırır. Stromanın oksidləşmə-reduksiya vəziyyəti bu tənzimləmədə də, rubisco-nun fəallığının rubisco-aktivaza ilə tənzimlənməsində olduğu kimi əsas rolu oynayır.
- C_3 bitkilərdə, Kalvin tsikli ilə fiksasiya olunmuş CO_2-nin əhəmiyyətli bir fraksiyası fototənəffüsün nəticəsi kimi, aşağı CO_2 və yüksək O_2 qatılığına meyilli olan, rubisco ilə kataliz olunan israfçı reaksiya vasitəsi ilə itirilə bilir (bax Şəkil 12-49).
- C_4 bitkilərdə, CO_2 əvvəlcə xarici mezofil hüceyrələrdə fosfoenolpiruvatla reaksiyada fiksasiya olunur. Əmələ gələn dörd-karbonlu molekullar daxili örtük-ötürücü hüceyrələrə daşınır, burada CO_2 buraxılır və sonra Kalvin tsiklində istifadə olunur. C4 bitkilərdə fototənəffüsün sürəti C_3 bitkilərə nisbətən çox aşağıdır.

Açar Sözlər

aerob oksidləşmə
ATP sintaza
ayırıcı-agent (unkoupler)
birləşmə-dəyişən mexanizm
C_4 yol
elektron nəqliyyat zənciri
endosimbiont fərziyyəsi
F_0F_1 kompeksi
flavinadenin dinukleotid (FAD)
fotoelektron nəqliyyatı
fotosintez
fotosistem
fototənəffüs
xlorofillər
Kalvin tsikli
karbon fiksasiyası
katobalizm
kemoosmozis
koenzim Q
Q tsikli
qıcqırma
Qlikoliz
limon turşusu tsikli
nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+)
oksidativ fosforlaşma
prostetik qrup
proton-hərəkətverici qüvvə
reaktiv oksigen nümunəsi
reduksiya potensialı
rubisco
sitoxrom
substrat-səviyyəsində fosforlaşma
tənəffüs
tənəffüs nəzarəti

Konsepsiyalara Baxış

1. Proton-hərəkətverici qüvvə (pmf) həm mitoxondri həm də xloroplast üçün əhəmiyyətli funksiyadır. Pmf-i yaradan nədir və onun ATP-yə aidiyyatı varmı? 1930-cu illərdə dietik tabletlərdə istifadə olunan 2,4-dinitrofenol (DNP) birləşməsinin sonralar təhlükəli yan təsirlərə malik olduğu göstərilmişdir. Nəyə görə DNP-ni istifadə etmək təhlükəlidir?
2. Guman olunur ki, mitoxondri və xloroplast nüvəli hüceyrələrdə simbioz yaşayan bakteriyalardan törəmişlər. Bu fərziyyəni bu fəsildə hansı eklsperimental sübutlar təsdiq edir?
3. Daxili mitoxondrial membran tipik hüceyrə membranının bütün xüsusiyyətlərini nümayiş etdirir, amma, eyni zamanda onun oksidləşdirici fosforlaşma yolu ilə sıx bağlı olan unikal xüsusiyyəti vardır. Bu unikal xüsusiyyət nədən ibarətdir? Bunların hər biri mitoxondrinin daxili membranının fəaliyyətinə necə kömək edir?
4. ATP-nin qlükozadan maksimum istehsalına qlikoliz reaksiyası, limon turşusu tsikli və elektron nəqliyyatı zənciri daxildir. Bu reaksiyaların hansı O_2 tələb edir və nəyə görə? Nəyə görə bəzi orqanizmlərdə və ya fizioloji şəraitlərdə proses O_2 olmadan davam edir?

5. Qıcqırma oksigen olmadan qlükozada enerji ayrılmasının davam etməsinə imkan verir. Əgər qlükoza metabolizmi anaerobdursa, qlikolizin davam etməsi üçün qıcqırma nəyə lazımdır?
6. Elektronların sitoplazmada qlükoza katabolizmindən daxili mitoxondri membranında elektron nəqliyyat zəncirinə daşınması prosesini pillə-pillə təsvir edin. Siz cavabınızda, hər bir pillədə elektron ötürülməsinin bilvasitə və ya dolayı yolla olmasını qeyd edin.
7. Yağ turşularının mitoxondrial oksidləşməsi ATP-nin əsas mənbəyidir, bu yağ turşuları başqa bir orqanoiddə də oksidləşə bilirlər. Mitoxondridən başqa hansı orqanoid yağ turşularını oksidləşdirə bilir? Mitoxondrial oksidləşmə ilə həmin orqanoiddəki oksidləşmə arasındakı fərq nədən ibarətdir?
8. Mitoxondridə sitoxromların hər biri prostetik qrupa malikdirlər. Prostetik qrup nədir? Hansı tip prostetik qrup sitoxromlarla birləşmişdir? Müxtəlif sitoxromlarınn hansı xassəsi elektron nəqliyyat zəncirində biristiqamətli elektron axınını təmin edir?
9. Elektron nəqliyyat zənciri elektronların NADH kimi elektron daşıyıcısından O_2-ə ötürülməsində sıx əlbir fəaliyyət göstərən çoxsaylı multizülal komplekslərindən təşkil olunublar. Bu komplekslərin ATP sintezində rolu nədən ibarətdir? Nümayiş etdirilmişdir ki, tənəffüs superkompleksləri tənəffüs üçün lazım olan bütün zülal komponentlərinə malikdirlər. Nəyə görə ATP sintezi üçün bu faydalıdır, və superkomplekslərin mövcud olması hansı yolla eksperimental olaraq nümayiş etdirilmişdir? Koenzim (CoQ) zülal deyil, amma kiçik, hidrofob molekuldur. Həyə görə CoQ hidrofob molekul olduğu halda elektron nəqliyyat zəncirinin fəaliyyəti üçün çox əhəmiyyətlidir?
10. Belə təxmin edilir ki, NADH-la verilən hər bir cüt elekltron təxminən üç ATP molekulunun sintezinə səbəb olur, halbuki $FADH_2$ ilə verilən hər bir cüt elektron təxminən iki ATP molekulunun sintezinə səbəb olur. NADH-a qarşı $FADH_2$-nin verdiyi elektronların məhsuldarlığındakı bu fərqin əsas səbəbi nədən ibarətdir?
11. Mitoxondridə ATP sintez edən fermentin müxtəlif komponentlərinin əsas fəaliyyətini təsvir edin. Quruluşuna görə oxşar olan ferment lizosomların və endosomların turşlaşmasını həyata keçirir. ATP sintezinin mexanizmi barədə bildiyinizi nəzərə alaraq bu turşlaşmanın necə baş verə biləcəyini izah edin.
12. ATP sintezi barədə bizim anlayışlarımızın çoxu aerob bakteriyalardakı tədqiqatlardan alınmışdır. Bu tədqiqatlar üçün həmin orqanizmləri faydalı edən nədir? Bu orqanizmlərdə, qlikolizin, limon turşusu tsiklinin və elektron nəqliyyat zəncirinin reaksiyaları harada baş verir? Aerob bakteriyalarda pmf harada yaranır? Bu orqanizmlərdə hansı başqa hüceyrə prosesləri pmf-dən asılıdır?
13. Mitoxondrial daxili membranın çox əhəmiyyətli funksiyası suda-həll olan molekullara selektiv şəkildə keçiricilik baryerini yaratmaq və beləliklə membranın hər iki tərəfində fərqli kimyəvi mühit yaratmaqdır. Amma, oksidləşdirci fosforlaşmanın substratlarının və məhsullarının çoxu suda həll olanlardır və daxili membranı kəsib keçməlidirlər. Bu daşınma necə baş verir?
14. Q tsikl mitoxondrinin, xloroplastların və bakteriyaların elektron nəqliyyat zəncirində əsas rolu oynayır. Q tsiklinin funksiyası nədən ibarətdir, o bu funksiyanı necə yerinə yetirir? Hansı elektron daşıyıcı komponentlər mitoxondridə, purpur bakteriyalarda və xloroplastlarda Q tsiklində iştirak edirlər?
15. Düzdür ya səhv: xloroplastlarda ATP əmələ gəldiyindən, fotosintez etmə qabliyyətinə malik olan orqanizmlərin mitoxondriyə ehtiyacları yoxdur. İzah et. Mitoxondrilərin və xloroplastların eukaryotiok hüceyrələrə necə mənsub olmasını izah edən ideyanı adlandır və təsvir et.
16. Fotosintezin oksigen əmələ gətirən ümumi reaksiyasını yaz. Növbəti bəyanatı izah et: fotosintezlə əmələ gələn O_2 sadəcə olaraq, metabolik yolun əmələ gətirdiyi ATP və karbohidratın yan məhsuludur.
17. Fotosintez çoxsaylı mərhələlərə bölünə bilər. Fotosintezin hansı mərhələləri var və bunlar xloroplast daxilində harada baş verirlər? Fotosintez tərəfindən istehsal olunan saxaroza harada yaranır?
18. İşıq enejisinin udulmasına cavab verən fotosistemlərin hər biri iki əlaqəli komponentdən təşkil olunmuşlar, reaksiya mərkəzi və antenna kompleksi. Hər bir komponent hansı piqment tərkibinə və işığın udulmasında hansı rola malikdir? Bu komponentlərdə tapılmış piqmentlərin fotosintezdə iştirak etməsini təsdiq edən hansı dəlillər vardır?
19. Yaşıl və purpur bakteriyalarda fotosintez O_2 əmələ gətirmir. Nəyə görə? Bu orqanizmlər ATP sintez etmək üçün fotosintezdən necə istifadə edirlər? Bu orqanizmlərdə elektron donorunun mənbəyi kimi hansı molekullar iştirak edirlər?
20. Xloroplastlar iki fotosistemə malikdirlər. Onların hər birinin funksiyası nədən ibarətdir? Xətti elektron zənciri üçün, fotonun udulmasından NADPH sintezinə qədər elektron axınının diaqramını çəkin. NADPH şəkilində ehtiyat saxlanılan enerji nəyi sintez edir?
21. CO_2-ni fiksasiya edən Kalvin tsikli reaksiyaları qaranlıqda fəaliyyət göstərmir. Bunun guman olunan səbəbi nədir? Bu reaksiyalar işıqla necə tənzimlənirlər?
22. Çox guman ki, yer üzündə ən zəngin olan zülal rubisco fotosintezdən istifadə edən orqanizmlərdə karbohidratların sintezində əsas rolu oynayır. Rubisco nədir, o harada yerləşir və hansı funksiyanı yerinə yetririr?

İstinadlar

Qlükozadan Enerjini Toplamağın İlk Pilləsi: Qlikoliz

Berg, J., J. Tymoczko, and L. Stryer. 2012. *Biochemistry*, 7th ed. W. H. Freeman and Company. Chaps. 16–20.

Dasgupta, T., et al. 2014. A fundamental trade-off in covalent switching and its circumvention by enzyme bifunctionality in glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* **289**:13010–13025.

Depre, C., M. Rider, and L. Hue. 1998. Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur. J. Biochem.* **258**:277–290.

Fersht, A. 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W. H. Freeman and Company.

Fothergill-Gilmore, L. A., and P. A. Michels. 1993. Evolution of glycolysis. *Prog. Biophys. Mol. Biol. 59*:105–135.

Nelson, D. L., and M. M. Cox. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth. Chaps. 14–17, 19.

Pilkis, S. J., et al. 1995. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu. Rev. Biochem. 64*:799–835.

Mitoxondrinin Quruluşu və Funksiyası

Ahn, C. S., and C. M. Metallo. 2015. Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. *Cancer Metab.* **J3**:1.

Bonawitz, N. D., D. A. Clayton, and G. S. Shadel. 2006. Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol. Cell* **24**:813–825.

Canfield, D. E. 2005. The early history of atmospheric oxygen: homage to Robert M. Garrels. *Annu. Rev. Earth Pl. Sc.* **33**:1–36.
Friedman J. R., et al. 2011. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* **334**:358.
Giorgi, C., et al. 2015. Mitochondria-associated membranes: composition, molecular mechanisms, and physiopathological implications. *Antioxid. Redox. Signal.* **22**:995–1019.
Kamer, K. J., Y. Sancak, and V. K. Mootha. 2014. The uniporter: from newly identified parts to function. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **449**:370–372.
Kaufman, R. J., and J. D. Malhotra. 2014. Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta 1843*:2233–2239.
Las, G., and O. S. Shirihai. 2014. Miro1: new wheels for transferring mitochondria. *EMBO J.* **33**:939–941.
Mishra, P., and D. C. Chan. 2014. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**:634–646.
Miyawaki, A., et al.1997. Fluorescent indicators for Ca2+ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**:882–887.
Song, M., and G. W. Dorn II. 2015. Mitoconfusion: noncanonical functioning of dynamism factors in static mitochondria of the heart. *Cell Metab.* **21**:195–205.
Spät, A., et al. 2008. High- and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signalling. *Cell Calcium* **44**:51–63.
Tan, A. S., et al. 2015. Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab.* **21:**81–94.
Vance, J. E. 2014. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**:595–609.
van der Merwe, C., et al. 2015. Evidence for a common biological pathway linking three Parkinson's disease-causing genes: parkin, PINK1 and DJ-1. *Eur. J. Neurosci.* **41**:1113–1125.
Wang, X., and H. H. Gerdes. 2015. Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. *Cell Death Differ.* **22**:1181–1191.

Limon Turşusu Tsikli və Yağ Turşusu Oksidləşməsi

Canfield, D. E. 2005. The early history of atmospheric oxygen: homage to Robert M. Garrels. *Annu. Rev. Earth Pl. Sc.* **33**:1–36.
Chan, D. C. 2006. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* **125**(7):1241–1252.
Eaton, S., K. Bartlett, and M. Pourfarzam. 1996. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem. J.* **320** (Part 2):345–557.
Guest, J. R., and G. C. Russell. 1992. Complexes and complexities of the citric acid cycle in *Escherichia coli. Curr. Top. Cell. Regul.* **33:**231–247.
Krebs, H. A. 1970. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect. Biol. Med.* **14:**154–170.
Rasmussen, B., and R. Wolfe. 1999. Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Annu. Rev. Nutr.* **19**:463–484.
Velot, C., et al. 1997. Model of a quinary structure between Krebs TCA cycle enzymes: a model for the metabolon. *Biochemistry* **36**:14271–14276.
Wanders, R. J., and H. R. Waterham. 2006. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu. Rev. Biochem.* **75**:295–332.

Elektron-Nəqliyyat Zənciri və Proton-Hərəkətverici Qüvvənin Yaranması

Acin-Pérez, R., et al. 2008. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol. Cell* **32**:529–539.
Babcock, G. 1999. How oxygen is activated and reduced in respiration. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:12971–12973.
Beinert, H., R. Holm, and E. Münck. 1997. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277:**653–659.
Brandt, U. 2006. Energy converting NADH: quinone oxidoreductase (complex I). *Annu. Rev. Biochem.* **75**:165–187.
Brandt, U., and B. Trumpower. 1994. The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* **29**:165–197.
Daiber, A. 2010. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta* **6–7**:897–906.
Darrouzet, E., et al. 2001. Large scale domain movement in cytochrome bc1: a new device for electron transfer in proteins. *Trends Biochem. Sci.* **26**:445–451.
Dickinson, B. C., D. Srikun, and C. J. Chang. 2010. Mitochondrialtargeted fluorescent probes for reactive oxygen species. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**:50–56.
Dudkina, N. V., I. M. Folea, and E. J. Boekema. 2015. Towards structural and functional characterization of photosynthetic and mitochondrial supercomplexes. *Micron* **72:**39–51.
Efremov, R. G., R. Baradaran, and L. A. Sazanov. 2010. The architecture of respiratory complex I. *Nature* **465**:441–445.
Finkel, T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* **194**:7–15.
Grigorieff, N. 1999. Structure of the respiratory NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**:476–483.
Hosler, J. P., S. Ferguson-Miller, and D. A. Mills. 2006. Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **75**:165–187.
Hunte, C., V. Zickermann, and U. Brandt. 2010. Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science* **329**:448–451.
Hyde, B. B., G. Twig, and O. S. Shirihai. 2010. Organellar vs cellular control of mitochondrial dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**:575–581.
Koopman, W. J., et al. 2010. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxid. Redox Signal.* **12:**1431–1470.
Michel, H., et al. 1998. Cytochrome *c* oxidase. *Annu. Rev. Bioph. Biom. 27*:329–356.
Mitchell, P. 1979. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science 206*:1148–1159. (Nobel Prize lecture.)
Murphy, M. P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**:1–13.
Ramirez, B. E., et al. 1995. The currents of life: the terminal electron-transfer complex of respiration. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **92:**11949–11951.
Ruitenberg, M., et al. 2002. Reduction of cytochrome *c* oxidase by a second electron leads to proton translocation. *Nature* **417**:99–102.
Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* **283**:1488–1492.
Schafer, E., et al. 2006. Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* **281**(22):15370–15375.
Schultz, B., and S. Chan. 2001. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu. Rev. Bioph. Biom.* **30**:23–65.
Sheeran, F. L., and S. Pepe. 2006. Energy deficiency in the failing heart: linking increased reactive oxygen species and disruption of oxidative phosphorylation rate. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**(5–6):543–552.
Sies, H. 2014. Role of metabolic H2O2 generation: redox signaling and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **289**:8735–8741.
Tsukihara, T., et al. 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**:1136–1144.
Walker, J. E. 1995. Determination of the structures of respiratory enzyme complexes from mammalian mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1271**:221–227.
Wallace, D. C. 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* **39**:359–407.
Xia, D., et al. 1997. Crystal structure of the cytochrome *bc*1 complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**:60–66.
Zaslavsky, D., and R. Gennis. 2000. Proton pumping by cytochrome oxidase: progress and postulates. *Biochim. Biophys. Acta* **1458**:164–179.

Zhang, M., E. Mileykovskaya, and W. Dowhan. 2005. Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280**(33):29403–29408.
Zhang, Z., et al. 1998. Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc*1. *Nature* **392**:677–684.

Proton-Hərəkətverici Qüvvənin ATP Sintezi Üçün İstifadə Ediməsi

Aksimentiev, A., et al. 2004. Insights into the molecular mechanism of rotation in the F0 sector of ATP synthase. *Biophys. J.* **86**(3):1332–1344.
Allegretti, M., et al. 2015. Horizontal membrane-intrinsic α-helices in the stator α-subunit of an F-type ATP synthase. *Nature* **521:**237–240.
Bianchet, M. A., et al. 1998. The 2.8 Å structure of rat liver F1-ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **95:**11065–11070.
Boyer, P. D. 1997. The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem. 66*:717–749.
Capaldi, R., and R. Aggeler. 2002. Mechanism of the F0F1-type ATP synthase—a biological rotary motor. *Trends Biochem. Sci.* **27**:154–160.
Elston, T., H. Wang, and G. Oster. 1998. Energy transduction in ATP synthase. *Nature* **391**:510–512.
Hinkle, P. C. 2005. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1706**(1–2):1–11.
Junge, W., and N. Nelson. 2015. ATP synthase. *Annu. Rev. Biochem.* **84**:631–657.
Junge, W., S. Hendrik, and S. Engelbrecht. 2009. Torque generation and elastic power transmission in the rotary F0F1-ATPase. *Nature* **459:**364–370.
Kinosita, K., et al. 1998. F1-ATPase: a rotary motor made of a single molecule. *Cell* **93**:21–24.
Klingenberg, M., and S. Huang. 1999. Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **1415**:271–296.
Nury, H., et al. 2006. Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Annu. Rev. Biochem.* **75**:713–741.
Oliveira, A. S., et al. 2014. Exploring O2 diffusion in A-type cytochrome *c* oxidases: molecular dynamics simulations uncover two alternative channels towards the binuclear site. *PLoS Comput. Biol.* **10**:e1004010.
Rosen, E. D., and B. M. Spiegelman. 2014. What we talk about when we talk about fat. *Cell* **156**:20–44.
Sharma, V., et al. 2015. Role of subunit III and its lipids in the molecular mechanism of cytochrome *c* oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1847**:690–697.
Tsunoda, S., et al. 2001. Rotation of the **c** subunit oligomer in fully functional F0F1 ATP synthase. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:898–902.
Vercesi, A. E., et al. 2006. Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**:383–404.
von Ballmoos, C., A. Wiedenmann, and P. Dimroth. 2009.
Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**:649–672.
Wu, J., H. Jun, and J. R. McDermott. 2015. Formation and activation of thermogenic fat. *Trends Genet.* **31**:232–238.
Yasuda, R., et al. 2001. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase. *Nature* **410**:898–904.

Fotosintez və İşıq-Udan Piqmentlər

Bendich, A. J. 2004. Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion. *Plant Cell* **16:**1661–1666.
Ben-Shem, A., F. Frolow, and N. Nelson. 2003. Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* **426**(6967):630–635.
Blankenship, R. E. 2002. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis.* Blackwell.
Deisenhofer, J., and J. R. Norris, eds. 1993. *The Photosynthetic Reaction Center.* Vols. 1 and 2. Academic Press.
McDermott, G., et al. 1995. Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature 364*:517.
Nelson, N., and C. F. Yocum. 2006. Structure and function of photosystems I and II. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**:521–565.
Prince, R. 1996. Photosynthesis: the Z-scheme revisited. *Trends Biochem. Sci.* **21:**121–122.
Wollman, F. A. 2001. State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J.* **20**:3623–3630.

Fotosistemlərin Molekular Analizi

Allen, J. F. 2002. Photosynthesis of ATP—electrons, proton pumps, rotors, and poise. *Cell* **110**:273–276.
Amunts, A., et al. 2010. Structure determination and improved model of plant photosystem I. *J. Biol. Chem*. **285**:3478–3486.
Aro, E. M., I. Virgin, and B. Andersson. 1993. Photoinhibition of photosystem II: Inactivation, protein damage, and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**:113–134.
Deisenhofer, J., and H. Michel. 1989. The photosynthetic reaction center from the purple bacterium *Rhodopseudomonas viridis. Science* **245**:1463–1473. (Nobel Prize lecture.)
Deisenhofer, J., and H. Michel. 1991. Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**:1–23.
Dekker, J. P., and E. J. Boekema. 2005. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1706**(1–2):12–39.
Finazzi, G. 2005. The central role of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in revealing the mechanism of state transitions *J. Exp. Bot.* **56**(411):383–388.
Guskov, A., et al. 2010. Recent progress in the crystallographic studies of photosystem II. *ChemPhysChem.* **11**(6)**:**1160–1171.
Haldrup, A., et al. 2001. Balance of power: a view of the mechanism of photosynthetic state transitions. *Trends Plant Sci.* **6**:301–305.
Hankamer, B., J. Barber, and E. Boekema. 1997. Structure and membrane organization of photosystem II from green plants. *Annu. Rev. Plant Phys. 48*:641–672.
Heathcote, P., P. Fyfe, and M. Jones. 2002. Reaction centres: the structure and evolution of biological solar power. *Trends Biochem. Sci.* **27**:79–87.
Horton, P., A. Ruban, and R. Walters. 1996. Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Phys.* **47**:655–684.
Iwai, M., et al. 2010. Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis. *Nature* **464**: 1210–1213.
Joliot, P., and A. Joliot. 2005. Quantification of cyclic and linear flows in plants. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **102**(13):4913–4918.
Jordan, P., et al. 2001. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411**:909–917.
Kühlbrandt, W. 2001. Chlorophylls galore. *Nature* **411**:896–898.
Martin, J. L., and M. H. Vos. 1992. Femtosecond biology. *Annu. Rev. Bioph. Biom.* **21**:199–222.
Nelson, N., and W. Junge. 2015. Structure and energy transfer in photosystems of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **84**:659–683.
Penner-Hahn, J. 1998. Structural characterization of the Mn site in the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Struct. Bond.* **90:**1–36.
Shikanai, T. 2014. Central role of cyclic electron transport around photosystem I in the regulation of photosynthesis. *Curr. Opin. Biotech.* **26**:25–30.
Suga, M., et al. 2015. Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses. *Nature* **517:**99–103.
Tomizioli, M., et al. 2014. Deciphering thylakoid subcompartments using a mass spectrometry-based approach. *Mol. Cell. Proteomics* 13:2147–2167.
Tommos, C., and G. Babcock. 1998. Oxygen production in nature: a light-driven metalloradical enzyme process. *Accounts Chem. Res.* **31:**18–25.

Fotosintez Zamanı CO_2 Metabolizmi

Buchanan, B. B. 1991. Regulation of CO2 assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**:1–9.

Gutteridge, S., and J. Pierce. 2006. A unified theory for the basis of the limitations of the primary reaction of photosynthetic CO_2 fixation: was Dr. Pangloss right? *P. Natl. Acad. Sci. USA 103*:7203–7204.
Mueller-Cajar, O., M. Stotz, and A. Bracher. 2014. Maintaining photosynthetic CO2 fixation via protein remodelling: the Rubisco activases. *Photosynth. Res.* **119:**191–201.
Portis, A. 1992. Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Annu. Rev. Plant Phys.* **43**:415–437.
Rawsthorne, S. 1992. Towards an understanding of C3-C4 photosynthesis. *Essays Biochem.* **27**:135–146.
Rokka, A., I. Zhang, and E.-M. Aro. 2001. Rubisco activase: an enzyme with a temperature-dependent dual function? *Plant J.* **25**:463–472.
Sage, R., and J. Colemana. 2001. Effects of low atmospheric CO2 on plants: more than a thing of the past. *Trends Plant Sci.* **6**:18–24.
Schneider, G., Y. Lindqvist, and C. I. Branden. 1992. Rubisco: structure and mechanism. *Annu. Rev. Bioph. Biom.* **21**:119–153.
Tcherkez, G. G., G. D. Farquhar, and T. J. Andrews. 2006. Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose bisphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **103**(19):7246–7251.
Wolosiuk, R. A., M. A. Ballicora, and K. Hagelin. 1993. The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO2 assimilation: enzyme modulation. *FASEB J.* **7:**622–637.